

HISTOAUTHORADIOGRAPHISCHE IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN
AN DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS ZUR FRAGE
TAGESZEITLICHER VARIATIONEN DER DNS-SYNTHESEDAUER

von
Werner Egdmann
aus
Bamberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546209_0073

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. O. P. Hornstein

HISTO AUTORADIOGRAPHISCHE IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN AN DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS ZUR FRAGE TAGESZEITLICHER VARIATIONEN DER DNS-SYNTHESEDAUER*

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Werner Egdemann

aus

Bamberg

* Mit dankenswerter Unterstützung
durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft
(Ho 195/12)

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Schell
Korreferent: Prof. Dr. O.P. Hornstein
Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.1980

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. DIE PROLIFERATION DER EPIDERMIS UND IHRE UNTERSUCHUNG MITTELS DER HISTO AUTORADIOGRAPHIE	3
I. Epidermale Proliferationskinetik und Zellzyklus	3
II. Die Histoautoradiographie und ihre Anwendung unter in-vitro-Bedingungen	7
III. Der Markierungsindex	14
IV. Histoautoradiographische Methoden zur Bestimmung der S-Phasenlänge	15
C. TAGESZEITLICHE SCHWANKUNGEN VON MITOSEZAHLEN UND DES ^3H -INDEXES IN DER EPIDERMIS	22
D. ZUR FRAGE EINER TAGESZEITLICHEN KONSTANZ DER DNS-SYNTHESEDAUER	26
I. Die Bedeutung dieser Frage für die Bewertung von Schwankungen des Markierungsindex	26
II. Bereits vorliegende Befunde zur Frage tageszeitlicher Schwankungen der S-Phasenlänge	27
E. FRAGESTELLUNG	30
F. MATERIAL UND METHODE	32
I. Die Versuchspersonen	32
II. Entnahme der Biopsien	33
III. Die Inkubation	34
IV. Die histoautoradiographische Weiterverarbeitung	36
V. Die Auswertung der Autoradiogramme	37
G. ERGEBNISSE	39
H. DISKUSSION	55
I. Diskussion der Methodik	55
II. Diskussion der Ergebnisse	62
I. ZUSAMMENFASSUNG	67
K. LITERATURVERZEICHNIS	69

A. EINLEITUNG

Die meisten Funktionen des menschlichen Körpers unterliegen tageszeitlichen Schwankungen, das heißt, ihr Ablauf ist nicht gleichförmig, sondern weist Maxima und Minima auf, deren Auftreten an bestimmte Tageszeiten gebunden ist. Da die Periodenlänge derartiger Rhythmen (das ist der Abstand zwischen zwei Maxima) in etwa der Länge eines Tages entspricht, bezeichnet man sie als circadian (circa = ungefähr, dies = Tag).

Das bekannteste und mit am frühesten erforschte Beispiel hierfür ist der tagesrhythmische Verlauf der Körpertemperatur. Sie erreicht bekanntlich am Nachmittag ein Maximum, während die tiefsten Werte in der Nacht auftreten. Weitere bekannte Beispiele sind tageszeitliche Variationen von Kreislauf- und Atemgrößen, Organaktivitäten (Leber, Gastrointestinaltrakt, Niere, ZNS) sowie Inhaltsstoffen des Blutes (Blutkörperchenzahl, Elektrolyt- und Hormonkonzentrationen) (67, 17).

Wie die bisherige Rhythmusforschung zeigen konnte, handelt es sich bei all diesen Schwankungen um sogenannte endogene Funktionsrhythmen, das heißt, sie werden vom Organismus selbst bewirkt. Äußere Einflüsse, wie z. B. der Wechsel von Helligkeit und Dunkelheit, dienen als sogenannte Zeitgeber lediglich ihrer Synchronisation (67). Auf die interessante Frage nach Art und Sitz der sogenannten "Inneren Uhr" - wahrscheinlich sind es mehrere - soll in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden.

Die Kenntnis circadianer Rhythmen ist auch für die praktische Medizin von Bedeutung. So hat z. B. das Wissen, daß die Corticosteroidsekretion ein Maximum zu Beginn der Wachphase aufweist dazu geführt, daß bei Langzeittherapie mit Glucocorticoiden die gesamte Tagesdosis jeweils morgens gegeben wird. Auf diese Weise gelingt es, den therapeutischen Effekt bei niedrigerer Dosierung zu erreichen und gleichzeitig die Suppression der

Nebennierenrindensekretion mit der Gefahr einer Atrophie weitgehend zu verhindern.

Ähnliche Erfolge verspricht man sich aus den Erkenntnissen über unterschiedliche Wachstumsrhythmen gesunder und kranker Gewebe für die Behandlung von Erkrankungen, die mit Störungen der Proliferation einhergehen. Ein Ziel besteht z. B. in der Erarbeitung effektiverer Anwendungsmöglichkeiten von Zytostatika bei der Carcinomtherapie.

Auf dem Gebiet der Dermatologie könnte die Erforschung epidermaler Proliferationsrhythmen ebenfalls neue therapeutische Ansatzpunkte liefern. Insbesondere ist hierbei an Erkrankungen zu denken, wie z. B. das endogene Ekzem oder die Psoriasis vulgaris, die auf Störungen der Epidermisproliferation beruhen (29). Im Falle der Psoriasis vulgaris gibt es bereits Hinweise auf eine tageszeitliche Abhängigkeit dieser Proliferationsveränderungen (58). Darüberhinaus könnten Erkenntnisse über Wachstumsrhythmen der Haut bei der externen Anwendung bestimmter Dermatika, im besonderen auch corticosteroidhaltiger Zubereitungen, gewinnbringend angewandt werden.

Zur Erreichung dieser Ziele ist es nötig, zunächst die Kenntnisse über Proliferationsschwankungen der gesunden menschlichen Epidermis zu festigen bzw. zu erweitern. Dazu soll die vorliegende Arbeit einen kleinen Beitrag liefern.

B. DIE PROLIFERATION DER EPIDERMIS UND IHRE UNTERSUCHUNG MITTELS DER HISTO AUTORADIOGRAPHIE

Zum besseren Verständnis der bei der Besprechung bereits vorliegender Befunde über Wachstumsrhythmen der Haut auftauchenden Begriffe ist es notwendig, zunächst allgemein auf die epidermale Zellkinetik einzugehen. Insbesondere soll im folgenden die Technik der Autoradiographie beschrieben werden, der wir im wesentlichen unsere Erkenntnisse über die Proliferation der Epidermis verdanken.

I. Epidermale Proliferationskinetik

Histologisch stellt die Epidermis ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel dar. Aufgrund ihres proliferativen Verhaltens ist sie der Gruppe der "steady state"-Zellpopulationen zuzurechnen, bei denen Zellneubildungsrate und Zellverlustrate einander entsprechen, so daß die konstante Dicke gewährleistet ist (62).

Der Ersatz abgestorbener Zellen erfolgt durch mitotische Zellteilung im sogenannten Stratum germinativum. Während bei den meisten Tieren die zur DNS-Synthese und damit zur Mitose befähigten Zellen ausnahmslos in der der Basalmembran direkt anliegenden Basalzellschicht zu finden sind, sprechen an menschlicher Epidermis erhobene Befunde dafür, daß hier auch die unteren Schichten des Stratum spinosum dem Stratum germinativum angehören (50, 42, 66). Oehlert (50) spricht in diesem Zusammenhang von einer sogenannten Parabasalzellschicht, "deren einzelne Zellelemente hinsichtlich ihrer cytologischen Differenzierung alle Übergänge zwischen Basal- und Stratum spinosum-Zellen erkennen lassen".

Obwohl im Stratum germinativum ständig Mitosen stattfinden, bleibt die Zahl der in dieser Schicht befindlichen teilungs-

fähigen Zellen stets konstant. Zur Erklärung dieses Umstandes gibt es verschiedene Theorien.

Nach Ansicht von Pinkus und Hunter (57) sowie auch Oehlert (50) erfolgt die Teilung einer Basalzelle in vertikaler Richtung, wobei eine neue teilungsfähige Mutterzelle sowie eine in höhere Zellschichten auswandernde und damit ihre Mitosefähigkeit verlierende Tochterzelle entstehen (sogenannte inäquale Zellteilung). Demgegenüber geht Jarrett (39) von einer horizontalen Teilungsrichtung aus, wobei seiner Meinung nach zunehmender "Druck" in der Basalzellschicht zum Verdrängen reiferer, nicht mehr teilungsfähiger Basalzellen in höhere Schichten führt (sogenannte äquale Zellteilung).

Fest steht, daß die Epidermiszellen im Laufe ihrer Wanderung durch das Stratum spinosum in das Stratum granulosum ihre Fähigkeit zur DNS-Synthese verlieren und schließlich, zu Keratinocyten differenziert, das Stratum corneum erreichen. Hier erfolgt letztlich die Abstoßung der bereits kernlos gewordenen Zellen.

Die an der Proliferation teilnehmenden Zellen durchlaufen zwischen zwei Zellteilungen den sogenannten Zellzyklus, der in verschiedene Teilphasen unterteilt werden kann. Im einzelnen unterscheidet man folgende Abschnitte, die unterschiedliche physiologische Bedeutung haben (62, 12, 23):

1. G_1 = postmitotisch-präsynthetische Periode:

Sie wird auch als die Wachstumsphase der Zelle bezeichnet, da in ihr die während der Mitose stark reduzierte Proteinsynthese wieder aufgenommen wird. Auch die RNS-Synthese steigt rasch an. Für ihre Länge in der menschlichen Haut bestimmen Chopra und Flaxman (15) Werte zwischen 39,5 und 284 Stunden.

2. S = DNS-Syntheseperiode:

In ihr wird die DNS verdoppelt, so daß nach Abschluß dieser Phase die Chromosomen in Form zweier identisch aufgebauter Untereinheiten, den sogenannten Chromatiden, vorliegen. Die Bestimmung ihrer Dauer in der menschlichen Epidermis ist mit Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Bereits durch andere Autoren veröffentlichte Werte liegen in einem Bereich zwischen 5,9 und 16 Stunden (29).

3. G_2 = postsynthetisch-prämitotische Periode:

Nach Duspiya (23) werden in dieser Phase wichtige metabolische Vorbereitungen für die Mitose getroffen. Dabei wird wahrscheinlich eine Art "Teilungsprotein" synthetisiert, welches entweder selbst zum Aufbau des mitotischen Apparates oder anderer Organellen dient, oder aber diesen Aufbau katalysiert sowie deren Funktion ermöglicht. Die Länge der G_2 -Phase in der menschlichen Epidermis wurde von Chopra und Flaxman (15) mit 6 bis 8 Stunden bestimmt.

4. Mitose-Phase:

In dieser Periode, welche wiederum in Pro-, Meta-, Telo- und Anaphase zu unterteilen ist, findet nun die Teilung der Mutter- in zwei Tochterzellen statt, wobei das während der S-Phase verdoppelte DNS-Material genau gleich auf die beiden neuen Zellen verteilt wird. Die Mitosedauer beträgt in der menschlichen Haut etwa 1 bis 1,5 Stunden (15, 25).

Die zwischen den Mitosen gelegenen Perioden, also die G_1 -, S- sowie die G_2 -Phase werden zusammenfassend auch als Inter-Phase bezeichnet.

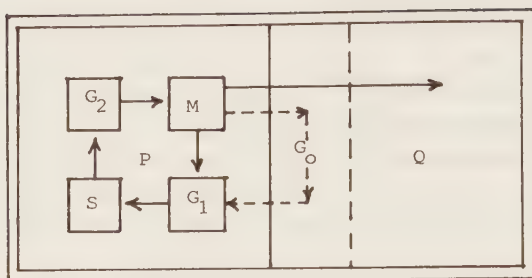


Abb. 1 Der Zellzyklus im "Multi-Compartment"-Modell
(modifiziert nach 62).

P = proliferierende Zellen = "effektive Growth Fraction"

Q = nicht-proliferierende Zellen

$P + G_0$ = "potentielle Growth Fraction"

weitere Erläuterungen im Text.

Nach dem "Multi-Compartment"-Modell proliferierender Zellsysteme (62) unterscheidet man das Proliferative Compartment, dessen Zellen ständig die oben beschriebenen Phasen des Zellzyklus durchlaufen, vom Nicht-proliferativen Compartment (siehe Abb. 1). Dieses enthält Zellen, die im Laufe ihrer Differenzierung die Fähigkeit zur DNS-Synthese irreversibel verloren haben. Daneben gibt es auch Zellen, die potentiell proliferationsfähig sind, sich möglicherweise in einer stark verlängerten G_1 -Phase befinden und nur unter bestimmten Bedingungen (z. B. erhöhter Zellverlust) wieder am Zellzyklus teilnehmen. Patt und Quastler (51) führten für die Gesamtheit dieser Zellen den Begriff des G_0 -Compartments ein. Sie verfeinerten den von Mendelsohn (49) für den proliferierenden Anteil einer Zellpopulation eingeführten Ausdruck

der "Growth Fraction", indem sie von einer "effektiven" und einer "potentiellen Growth Fraction" sprechen, wobei letzterem das G_0 -Compartment angehört.

Die Steuerung der epidermalen Zellproliferation, das heißt, die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Zellverlust und Zellneubildung wird durch einen innergeweblichen Feed-back-Mechanismus bewerkstelligt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die sogenannten Chalone (9), gewebes- jedoch nicht artspezifische Glykoproteide mit mitosehemmender Wirkung.

Ihre Entdecker, Bullough und Laurence (10, 11), konnten später zeigen, daß der Effekt der Chalone durch die Anwesenheit von Adrenalin wesentlich verstärkt wird, obwohl Adrenalin alleine kein Mitosehemmstoff ist. Eine weitere Unterstützung erfährt dieses System durch Glucocorticoidhormone, welche offensichtlich ein Absinken des Adrenalinspiegels verhindern und so die Chalon-Adrenalin-Wirkung verlängern.

Der primäre Effekt des Chalon-Adrenalin-Komplexes besteht nach heutiger Ansicht in einer Aktivierung der zellmembranständigen Adenylatcyclase, welche die Umwandlung von Adenosin-triphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert (22, 77). Zur Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase scheint ein bestimmtes Verhältnis zwischen cAMP und cGMP notwendig zu sein, welches durch das Funktionieren des Chalon-Adrenalin-Systems gewährleistet wird.

II. Die Histoautoradiographie und ihre Anwendung unter in-vitro-Bedingungen

Mit den Methoden der Histoautoradiographie wird nur die "effektive Growth Fraction" erfaßt, also jene Population, deren Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung den Zellzyklus

durchlaufen. Den Ansatzpunkt bieten dabei die physiologischen Abläufe bei der Synthetisierung der DNS während der S-Phase.

Die Histoautoradiographie bedient sich hierbei auf elegante Art und Weise der Tatsache, daß lebende Zellen, in deren Strukturen radioaktiv markierte Bausteine aufgenommen wurden, selbst zur Strahlungsquelle werden. Sie sind somit in der Lage, photographische Schichten durch Bildung metallischen Silbers zu schwärzen und können so in histologischen Präparaten nachgewiesen und lokalisiert werden (74, 1).

Zur Untersuchung proliferationskinetischer Fragestellungen bietet die DNS aufgrund der biochemischen Besonderheiten ihrer Synthese und ihres Abbaues besonders günstige Ansatzpunkte (6, 62): Die in den Zellkernen synthetisierten Nucleinsäuren (RNS und DNS) bestehen aus langen Ketten über Phosphatbrücken miteinander verbundener Nucleoside, die im einzelnen wiederum aus der Verknüpfung einer Pentose mit einer Purin- bzw. Pyrimidinbase entstehen. Während die Purinbasen Adenin und Guanin sowohl am Aufbau der DNS als auch der RNS beteiligt sind, ist von den Pyrimidinbasen nur das Cytosin in beiden Nucleinsäurearten zu finden. Von den anderen beiden Pyrimidinbasen kommt das Uracil nur in der RNS vor, während das Thymin selektiv in die DNS eingebaut wird.

Bietet man nun lebenden Zellen auf eine der weiter unten beschriebenen Arten das Nucleosid Thymidin an, welches mit einem β -strahlenden Isotop (z. B. ^3H oder ^{14}C) markiert wurde, so wird dieses streng selektiv in die zum Untersuchungszeitpunkt synthetisierte DNS eingebaut. Somit gelingt es, innerhalb eines begrenzten Gewebeabschnittes, alle Kerne, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt gerade in der DNS-Synthese-

phase befinden, radioaktiv zu kennzeichnen und deren Schicksal weiter zu verfolgen. Neben der hohen Spezifität des Thymidins hinsichtlich seines zeitlich begrenzten Einbaues nur während der S-Phase ist ein weiterer Grund für seine gute Verwendbarkeit innerhalb autoradiographischer Methoden durch die äußerst geringe Abbaurate der DNS gegeben.

Von den zur Markierung des Thymidins geeigneten β -Strahlern hat das Tritium (^3H) besondere Vorteile. Wegen seiner geringen Maximalenergie und der damit verbundenen geringen Reichweite in der photographischen Schicht ergibt sich ein besonders gutes Auflösungsvermögen (74). In den histoautoradiographischen Präparaten erreicht man somit eine feinkörnige, streng auf den Bereich über den markierten Zellkernen begrenzte Schwärzung. Darüberhinaus liegt das durch Abbauvorgänge freiwerdende Tritium im wesentlichen in Form von THO, chemisch also Wasser, vor und kann durch geeignete Auswasch- und Fixationsmethoden leicht aus dem zu untersuchenden Gewebe entfernt werden (62). Neben dem Tritium findet vor allem das Kohlenstoffisotop ^{14}C , z. B. bei der weiter unten beschriebenen Doppelmarkierungsmethode, Verwendung.

Allgemein läßt sich die Technik der Histoautoradiographie wie folgt beschreiben: Während eines definierten Zeitraums, der sogenannten Verfügbarkeitszeit, bietet man lebendem Gewebe radioaktiv markiertes Thymidin an. Dieses wird nun im Laufe der DNS-Synthese in die Zellkerne eingebaut. Nach der Abtötung und chemischen Fixierung des Gewebes werden histologische Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Diese überzieht man mit einer photographischen Emulsion oder einem Spezialfilm. Während der sogenannten Expositionszeit werden die Präparate nun in der Dunkelkammer belassen. Danach wird die photographische Schicht entwickelt und fixiert. Abschließend erfolgt durch diese Schicht hin-

durch die Färbung der Schnitte. In den nun vorliegenden histoautoradiographischen Präparaten erkennt man diejenigen Zellen, die während der Verfügbareitszeit des Thymidins DNS synthetisierten an einer Anhäufung von Silberkörnern über den Kernen.

Zur Verabreichung des radioaktiv markierten Thymidins sind grundsätzlich zwei Methoden zu unterscheiden:

1. Die in-vivo-Methodik (74, 1, 42, 43):

Hierbei verbleibt das zu untersuchende Gewebe zunächst im Organverband des lebenden Organismus. Das radioaktive Thymidin wird systemisch (z. B. intravenös, intraarteriell, intraperitoneal oder, bei Untersuchungen an der Haut, intracutan) appliziert. Erst nach Ablauf eines bestimmten Zeitraumes wird das Gewebe bioptisch oder nach Tötung des Organismus entnommen. Sodann erfolgt die oben beschriebene Weiterverarbeitung.

2. Die in-vitro-Methodik (74, 1, 62, 42, 43, 27, 24, 45, 48):

Hierbei wird die Gewebeprobe sofort entnommen und für bestimmte Zeit in einem Nährmedium, das das radioaktive Thymidin enthält, inkubiert. Die anschließende Weiterverarbeitung entspricht der bei der in-vivo-Methodik.

Es liegt auf der Hand, daß, wo immer möglich, die Anwendung der in-vivo-Methodik anzustreben ist, da hierbei das Gewebe im normalen Organverband bleibt und somit von einer weitgehend ungestört ablaufenden Proliferation ausgegangen werden darf. Jedoch verbietet sich ihre Anwendung beim Menschen wegen der langen Halbwertszeiten der verwendeten Substanzen (12,3 Jahre für ^3H bzw. 5730 Jahre für ^{14}C) und der damit verbundenen Strahlenbelastung. Lediglich die intracutane Injektion geringer Mengen der radioaktiven Substanz für Untersuchungen an

der menschlichen Epidermis ließe sich unter Umständen verantworten. Lachapelle (42) weist jedoch auf Nachteile speziell dieser Methode hin, die ihre Ursache in dem durch die Injektion bedingten Trauma oder in der ungleichmäßigen Verteilung des injizierten Thymidins haben können. Man ist daher bestrebt, für Untersuchungen an menschlichem Excisionsmaterial die in-vitro-Methodik so zu vervollkommen, daß eine möglichst lange ungestörte Weiterproliferation des entnommenen Gewebes im Nähmedium gewährleistet ist. Hierbei spielt die Wahl der Inkubationsbedingungen, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll, eine wichtige Rolle.

So wird bei der Inkubation unter in-vitro-Bedingungen nur in den Randbereichen des untersuchten Gewebeblockes eine ausreichende Markierung der Zellen erreicht, die zur Tiefe hin abnimmt. Wie Rajewski (61, 62) anhand von Berechnungen und experimentellen Untersuchungen an Lebergewebe von Ratten zeigen konnte, entspricht diese Randzone ungestörter DNS-Synthese, bei atmosphärischem O_2 -Partialdruck, mit ca. 100μ der halben von Warburg (78) angegebenen maximalen O_2 -Diffusionsstrecke im Gewebe (sogenannte Warburg'sche "limitierende Schnittdicke"). Folgerichtig gelang es ihm und anderen Autoren, diesen Randbereich durch Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes im Inkubationsmedium bis auf 500μ auszudehnen (82, 24, 35). Jedoch ist eine beliebige Erhöhung des O_2 -Partialdruckes wegen der dann auftretenden toxischen Effekte des Sauerstoffes nicht möglich.

Zur Erzielung aussagefähiger Ergebnisse mittels der in-vitro-Methodik ist die Wahl der Inkubationsdauer von entscheidender Bedeutung. Besonders während sogenannter Langzeitinkubationen über mehrere Stunden machen sich Störungen im Ablauf des Zellzyklus bemerkbar. So konnte das Auftreten markierter Mitosen unter in-vitro-Bedingungen nur von wenigen Autoren (16, 47) beschrieben werden. Andere Untersucher (62, 24, 71, 73) weisen

ausdrücklich auf das Fehlen von Mitosebildern hin. Übereinstimmend wird in der Literatur ein zu Beginn der Inkubation linearer Anstieg der Zahl markierter Zellen beschrieben, der sich im Laufe der Zeit asymptotisch einem konstanten Wert nähert (62, 24, 48, 35, 36, 16, 47, 71, 73, 59). Die Arbeiten von Schmid et al. (71, 73) deuten darauf hin, daß schon nach Überschreiten der 60-Minutengrenze mit Einflüssen zu rechnen ist, die den Neueintritt von Zellen in die S-Phase sowie die DNS-Synthese selbst zu stören vermögen. Bei Versuchen von Heckel (33) traten sogar schon ab der 30. Inkubationsminute derartige Störungen auf. Die Untersuchungen anderer Autoren (47, 36, 59) ergaben jedoch eine Kontinuität der DNS-Synthese zumindest während der beiden ersten Stunden.

Bei der Beschreibung der Doppelmarkierungsmethode zur Bestimmung der S-Phasenlänge (siehe unten) wird deutlich werden, daß insbesondere hier ein ungestörter Neueintritt von Zellen in die S-Phase während der gesamten Versuchsdauer gewährleistet sein muß und somit der Wahl der Inkubationsdauer besondere Bedeutung zukommt.

In diesem Rahmen muß jedoch auch auf Arbeiten hingewiesen werden, die zeigen, daß bei zu kurzer Inkubation von den in-vivo-Ergebnissen abweichende Werte erzielt werden (35, 36, 20). Für Einzelmarkierungen wird daher im allgemeinen eine Inkubationsdauer von mindestens 60 Minuten empfohlen.

Wie alle physikalischen und chemischen Vorgänge läßt sich auch der Zellzyklus durch Änderungen der Umgebungstemperatur, hier speziell der Temperatur des Inkubationsmediums, beeinflussen. Reaven und Cox (63) zeigten an Organkulturen menschlicher Haut, daß eine Erniedrigung der Temperatur zur Hemmung der Mitoseaktivität führt. Christophers und Schaumlöffel (16) fanden bei ihren in-vitro-Versuchen an menschlicher Epidermis

zur Bestimmung der S-Phasenlänge mittels Doppelmarkierung eine Verkürzung der DNS-Synthesedauer bei Erhöhung der Inkubationstemperatur von 37° C auf 42° C. Schmid et al. (73) ermittelten für die Wangenschleimhaut von Ratten eine optimale Inkubationstemperatur von 37° C. Im Vergleich zu den bei 36° C und 38° C gefundenen Werten zeigte sich hier eine deutlich höhere Einbaurrate von ³H-Thymidin, die auch am ehesten den in-vivo ermittelten Resultaten entsprach. Darüberhinaus wiesen die für diese Temperatur bestimmten ³H-Indices auch eine geringere Streubreite der ermittelten Einzelwerte auf.

Diese Ergebnisse bestätigen die plausible Annahme, daß die genauesten Meßwerte bei Inkubationstemperaturen zu erreichen sind, die den in-vivo herrschenden Verhältnissen entsprechen.

In die gleiche Richtung weisen eigene Versuche zur Ermittlung der optimalen Inkubationstemperatur an menschlicher Epidermis (67). Es zeigte sich, daß bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von 32° C die ³H-Indices gleichzeitig inkubierter Hautstückchen am wenigsten voneinander abwichen (siehe auch Kapitel Diskussion, S. 59 f.).

Nach den bisherigen Ausführungen erscheint es denkbar, daß auch die Art des Inkubationsmediums für eine ungestörte Zellkinetik unter in-vitro-Bedingungen von Bedeutung sein könnte. Es gibt jedoch in der Literatur keine Hinweise auf Probleme, die mit der üblichen Verwendung synthetischer Nährmedien, zumindest für Kurzzeitinkubationen (wenige Stunden), zusammenhängen. Pullmann und Schumacher (59) konnten vielmehr zeigen, daß bei der Inkubation menschlicher Epidermis in einem synthetischen Medium die gleichen Werte gefunden werden wie bei der Verwendung autologen Plasmas. Zu entsprechenden Ergebnissen kamen auch andere Autoren (33).

Die genaue Kenntnis der oben beschriebenen Einflußmöglichkeiten auf die Proliferationskinetik ermöglicht es, durch eine sorgfältige Auswahl der Inkubationsbedingungen, auch unter in-vitro-Bedingungen Ergebnisse zu erzielen, die den mit der in-vivo-Methodik ermittelten weitgehend entsprechen. Dies bestätigen Arbeiten, die sich speziell dem direkten Vergleich der beiden Methoden widmen. Neben den von Helpap und Maurer (35) beschriebenen Tierversuchen, in denen gezeigt werden konnte, daß in beiden Fällen dieselben Zellen das angebotene Thymidin einbauen, zeigen die von Lachapelle (42, 43, 44) unter anderem auch an menschlicher Epidermis durchgeführten Experimente, daß mit beiden Methoden gleiche Markierungsindices erzielt werden.

III. Der Markierungsindex

Vor Einführung der Histoautoradiographie war man darauf angewiesen, aus der Anzahl von Mitosefiguren auf die proliferative Aktivität des untersuchten Gewebes zu schließen. Als Parameter hierfür verwendete man den sogenannten Mitose-Index. Er ist definiert als das Verhältnis von Mitosezahl zur Gesamtzahl einer Zellpopulation. Für menschliche Haut ermittelte Fisher (25) folgende Werte: 1,44 Mitosen/1000 Epidermiszellen für ein männliches sowie 1,17 Mitosen/1000 Epidermiszellen für ein weibliches Kollektiv.

Die Auswertung histoautoradiographischer Präparate nach Markierung mit ^3H -Thymidin ermöglicht die Berechnung des sogenannten ^3H -Index (= Markierungsindex). Er entspricht dem Quotienten aus der Zahl markierter Zellen und der Gesamtzahl der Zellen (74). Aus den im folgenden dargelegten Gründen ist er dem Mitose-Index in seiner Aussagekraft überlegen. So ist die quantitative Erfassung von Mitosefiguren in fixierten Geweben oft schwierig. Rajewski (62) weist außerdem darauf

hin, daß die für die radioaktive Markierung maßgebliche S-Phase etwa um den Faktor 10 länger als die Mitosedauer und somit die Zahl markierter Zellen gegenüber der Zahl der Mitosen entsprechend höher ist. Dies gewährleistet eine statistisch genauere Ermittlung des ^3H -Index im Vergleich zum Mitose-Index. Es sei noch angemerkt, daß das Erkennen markierter Zellen im Histoautoradiogramm wesentlich einfacher ist als das Erkennen von Mitosebildern in histologischen Präparaten und somit Auswertungsfehler wesentlich seltener sein dürften.

Nach Rajewski (62) ist bei Vernachlässigung der Zellverluste und unter der Annahme einer konstanten Häufigkeitsverteilung der Zellen über den Zellzyklus sowie bei Kenntnis der S-Phasenlänge (t_s) die Proliferationsrate einer Zellpopulation ($\frac{dN}{dt}$) durch folgende Beziehung gegeben:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{{}^3\text{H-Index} \cdot N}{t_s}$$

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß der Markierungsindex alleine nur eine eingeschränkte Aussagekraft hat. Nach Schultze (74) kann er wegen seiner Abhängigkeit von der S-Phasenlänge und der Generationszeit nur als grobes Maß für die Proliferation dienen.

IV. Histoautoradiographische Methoden zur Bestimmung der S-Phasenlänge

Neben der Bestimmung des Markierungsindexes ermöglicht die Histoautoradiographie auch die Ermittlung der DNS-Synthesedauer. Hierzu stehen im wesentlichen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung:

1. Das ^3H -markierte Mitoseverfahren:

Nach dieser von Quastler und Sherman (60) entwickelten Methode bestimmt man den prozentualen Anteil markierter Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer einmaligen Injektion von ^3H -Thymidin. Der Zeitraum zwischen dem ersten Auftreten markierter Mitosen und dem darauffolgenden Wiederauftreten unmarkierter Mitosen entspricht der S-Phasendauer. Darüberhinaus ermöglicht diese Methode auch die Bestimmung der anderen Teilphasen des Zellzyklus. Ihr Nachteil liegt in der notwendigerweise langen Versuchsdauer. Bei Geweben mit geringer Proliferationsrate erscheint sie wegen der geringen Anzahl von Mitosen kaum anwendbar (74). Die Anwendung unter in-vitro-Bedingungen ist gänzlich unmöglich.

(Eine weitere Auseinandersetzung mit den Ergebnissen dieser Methode erfolgt im Kapitel "Diskussion".)

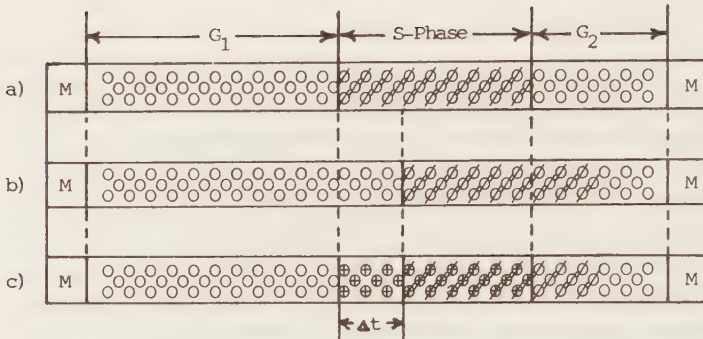
2. Die Doppelmarkierungsmethode:

Diese Methode (37, 52, 81) bietet gegenüber der vorher beschriebenen einige Vorteile. Zum einen ist sie nicht auf das Vorhandensein markierter Mitosen angewiesen, und zum anderen ist sie wesentlich weniger zeitaufwendig. Aufgrund dieser Tatsachen ist ihre Anwendung auch unter den in-vitro-Bedingungen der Kurzzeitinkubation möglich. Sie wurde daher für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet.

Üblicherweise erfolgt die Doppelmarkierung mit den beiden Isotopen ^{14}C und ^3H . Wegen ihrer unterschiedlichen Strahlenenergien verfügen die von ihnen ausgesandten β -Teilchen über unterschiedliche Reichweiten in der photographischen Schicht. Im Histoautoradiogramm erkennt man daher die von der extrem weichen β -Strahlung des ^3H (mittlere β -Energie: 5,7 keV)

hervorgerufene Markierung an den feinen Silberkörnern, die streng auf den Bereich des Zellkerns begrenzt vorliegen. Demgegenüber erzeugen die energiereicheren β -Teilchen des ^{14}C (mittlere β -Energie: 49 keV) sogenannte Bahnsuren sowie größere Silberkörner, die auch in der Umgebung des markierten Zellkernes zu finden sind. Doppelt markierte Zellen zeigen eine starke Silberkornanhäufung im Bereich des Kernes sowie in dessen Umgebung reichende "Randfransen" (1).

Zur Ermittlung der S-Phasenlänge geht man folgendermaßen vor: Man bietet dem zu untersuchenden Gewebe zunächst Thymidin an, das mit einem der beiden Isotope gekennzeichnet wurde (z. B. ^{14}C -Thymidin). Dies kann sowohl durch Injektion als auch durch zeitlich begrenzte Inkubation in einem Nähmedium erfolgen. Alle Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt gerade in der S-Phase befinden, bauen nun das ^{14}C -Thymidin in ihren Kern ein. Nach Ablauf eines bestimmten Zeitraumes Δt (meist nach 30 bis 60 Minuten) verabfolgt man dem Gewebe das mit dem anderen Isotop versehene Thymidin, in unserem Beispiel also ^3H -Thymidin. Wiederum werden alle Zellkerne markiert, die sich jetzt in der S-Phase befinden. Nach Abschluß des Versuches findet man im Histoautoradiogramm drei verschiedene Arten markierter Zellen:



$\bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc$ = unmarkierte Zellen

$\bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc$ = ¹⁴C-markierte Zellen

$\bigoplus \bigoplus \bigoplus \bigoplus \bigoplus$ = ³H-markierte Zellen

$\bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc$ = doppelt markierte Zellen

Abb. 2 Schematische Darstellung der Bestimmung der S-Phasendauer durch Doppelmarkierung mit ¹⁴C-Thymidin und ³H-Thymidin.

- Erste Markierung mit ¹⁴C-Thymidin
- Nach Ablauf von t sind neue Zellen in die S-Phase eingetreten, während ein Teil der markierten Zellen dieselbe verlassen hat.
- Nach Ablauf von t erfolgt die zweite Markierung mit ³H-Thymidin. Man erhält drei Arten markierter Zellen.

$$\text{Es gilt: } \frac{t_S}{\Delta t} = \frac{\text{Zahl der } ^{14}\text{C-Kerne (mit und ohne } ^3\text{H})}{\text{Zahl der rein } ^3\text{H-markierten Kerne}}$$

- a) Diejenigen Zellen, welche während des Zeitraumes Δt ihre S-Phase beendigten und in die G_2 -Phase übertraten, zeigen eine reine ^{14}C -Markierung.
- b) Eine andere Zellpopulation ist erst nach dieser Zeit neu aus der G_1 -Phase in die S-Phase eingetreten und hat daher nur während des zweiten Versuchsabschnittes radioaktives Thymidin einbauen können. Sie erhielt also eine reine ^3H -Markierung.
- c) Der größte Teil der markierten Zellen befand sich jedoch sowohl am Anfang des Versuches als auch nach Ablauf von Δt in der S-Phase und erhielt somit eine Doppelmarkierung.

Für die Zellen eines "steady-state"-Systems wie z. B. der menschlichen Epidermis läßt sich, unter Annahme einer Konstanz im Ablauf der S-Phase während des Versuches, die S-Phasendauer (t_S) aus der folgenden einfachen Beziehung berechnen (siehe auch Abb. 2):

$$t_S = \frac{\text{Zahl der } ^{14}\text{C-Kerne (mit und ohne } ^3\text{H}) \cdot \Delta t}{\text{Zahl der rein } ^3\text{H-markierten Kerne}}$$

Bei der Untersuchung von Geweben, die ein exponentielles Wachstum aufweisen wie z. B. Tumorgewebe, ist die ungleiche Häufigkeitsverteilung der Zellen über den Generationszyklus zu berücksichtigen. Bei der Berechnung der S-Phasendauer ist daher die Einführung eines Korrekturfaktors notwendig. Das hierfür von Lennartz und Maurer (46) angegebene Auswertungsverfahren ermöglicht die gleichzeitige Ermittlung der Generationszeit.

Eine Abwandlung der eben beschriebenen Doppelmarkierungsmethode wurde von Wegener, Hollweg und Maurer (79) eingeführt: Anstelle der beiden verschiedenen Isotope benutzten sie ^3H -

Thymidin in unterschiedlicher Dosierung. Die erste Markierung erfolgt mit einer geringen Dosis ^3H -Thymidin. Die Intensität der zweiten Markierung ist etwa um den Faktor 10 stärker. Zur Berechnung der S-Phasenlänge dient das Verhältnis aus stark und schwach markierten Zellen, analog den vorangehend angestellten Überlegungen, nach der Formel (72):

$$t_S = \frac{y \cdot \Delta t}{x}$$

wobei y die Zahl der von der hohen Dosis des ^3H -Thymidin markierten Zellkerne und x die Zahl der alleine von der niedrigen Dosis getroffenen Zellkerne ist, die während Δt die S-Phase beendet hatten.

Außer den beiden eben beschriebenen "klassischen" Methoden ermöglicht auch die Bestimmung der Eintrittsrate von Zellen in die S-Phase sowie deren Austrittsrate eine Berechnung der DNS-Synthesedauer. Dieses Vorgehen wählte z. B. Tvermyr (76) in einer Arbeit, auf die an anderer Stelle noch näher eingegangen wird (siehe S. 28 f.)

Im Gegensatz zu den oben erläuterten Methoden zur direkten Messung der DNS-Synthesedauer erlaubt die Ermittlung der Silberkorndichte nur Rückschlüsse auf die S-Phasenlänge, nicht jedoch deren genaue Berechnung. Koburg und Maurer (41) bestimmten für verschiedene Zellarten der Maus die mittlere Silberkornzahl/Zellkern nach einmaliger Injektion von ^3H -Thymidin. Sie sahen diesen Wert als Maß für die DNS-Syntheserate an und vermuteten, da sie für die verschiedenen Zellarten nahezu identische Werte fanden, daß die S-Phasenlänge in allen untersuchten Geweben gleich sein müßte. Pilgrim und Maurer (55) konnten diese Annahme mit Hilfe der Doppelmarkie-

rung bestätigen. Für 27 verschiedene Zellarten von Maus und Ratte bestimmten sie ohne größere Abweichungen eine mittlere S-Phasendauer von 7,5 Stunden. Ausnahmen stellen die Epithelien der Ohrepidermis mit 18 Stunden sowie die Spermatogonien dar. Für letztere wurde eine S-Phase von 26 Stunden ermittelt (37). Da die für diese beiden Gewebearten bestimmten Silberkornzahlen/Kern etwa um den Faktor 3 geringer als bei den anderen Zellarten sind, schlossen Pilgrim und Maurer (55), daß die Kornzahl/Kern offenbar umso kleiner ist, je länger die S-Phase dauert.

C. TAGESZEITLICHE SCHWANKUNGEN VON MITOSEZAHLEN UND DES
³H-INDEXES IN DER EPIDERMIS

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das Wachstum der Haut ebenso wie das anderer epithelialer und auch mesenchymaler Gewebe tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Die weitaus meisten dieser Befunde wurden in Tierversuchen ermittelt. Als Parameter dienten in diesen Untersuchungen der Mitose-Index (21, 2, 7, 8, 32, 69, 75) sowie, nach Einführung der Histoautoradiographie, auch der ³H-Index (53, 54, 76, 65). Dabei konnten Pilgrim et al. (53, 54) zeigen, daß alle Gewebe, die Schwankungen des Mitose-Indexes aufweisen, ohne Ausnahme auch Variationen des ³H-Indexes zeigten. Im allgemeinen werden die Maxima beider Parameter während der Ruheperiode, also nachts, gefunden, während die Minima meist am Tag auftreten. Schon früh postulierte Bullough (7, 8) eine umgekehrte Proportionalität zwischen mitotischer und körperlicher Aktivität. Später verwiesen er und Laurence (10, 11) dann auf die während der Aktivitätsphase vermehrte Ausschüttung des Adrenalins und der Glucocorticoide, die gemeinsam die Wirkung der Chalone (siehe S. 7) verstärken. Andere Autoren stellen die Bedeutung des Lichtes als Synchronisator in den Vordergrund (32).

Im Verhältnis zu den zahlreichen an Versuchstieren ermittelten Ergebnissen liegen uns nur relativ wenige Untersuchungen über Proliferationsrhythmen der menschlichen Epidermis vor. Die meisten davon sind Transversalstudien und daher zum Nachweis einer individuellen Rhythmik nicht geeignet. Die Gründe hierfür liegen auf der Hand: Um möglichst aussagefähige Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig, in einer Longitudinalstudie den Versuchspersonen über möglichst lange Zeit hinweg (mehrere Tage) in möglichst kurzen Abständen Hautbiopsien zu entnehmen. Dies stellt naturgemäß eine große Belastung dar. Zusätzliche

Untersuchungen über die Auswirkung von Stressfaktoren und die damit verbundenen Hormonausschüttungen, die in diesem Zusammenhang von großem Interesse sind, beanspruchen die Bereitschaft der Probanden bis an die Grenze des Zumutbaren.

Als erste berichteten Cooper und Schiff (18) in einer Transversalstudie über schwankende Mitosezahlen an der Epidermis Neugeborener, die bei zu verschiedenen Tageszeiten durchgeführten Circumcisionen gewonnen wurden. Dabei ermittelten sie die größte Mitosehäufigkeit an dem um ca. 22.00 Uhr angefallenen Operationsmaterial, während das Minimum in etwa um 10.00 Uhr gefunden wurde. Dieses Ergebnis wurde später von Cooper (19) selbst sowie von Broders und Dublin (3) in gleichartigen Untersuchungen, mit nur geringen Abweichungen, bestätigt.

Die ersten Befunde von der Epidermis Erwachsener stammen von Scheving (68). In einer Transversalstudie bestimmte er die Mitosezahlen am Biopsiematerial (Schulter) männlicher Versuchspersonen (Durchschnittsalter: 20 Jahre) über einen Zeitraum von 22 Stunden. Dabei fand er ein Maximum zwischen 24.00 Uhr und 3.00 Uhr sowie ein geringer ausgeprägtes um 14.00 Uhr. Ein Minimum ermittelte er für den Zeitraum von 10.00 Uhr bis 13.00 Uhr.

Auch in der Arbeit von Fisher (26), ebenfalls einer Transversalstudie, wurden proliferative Schwankungen anhand der Mitosehäufigkeit festgestellt. Am Biopsiematerial männlicher Erwachsener ermittelte auch er ein nächtlicher Maximum (zwischen 1.00 Uhr und 3.00 Uhr) sowie ein Nebenmaximum um 7.00 Uhr. Die geringste Mitosehäufigkeit fand er um 13.00 Uhr. In derselben Veröffentlichung konnte Fisher zeigen, daß es möglich ist, durch körperlichen Stress das Auftreten von Mitosen nahezu vollständig zu unterdrücken und somit den normalerweise von ihm gefundenen Anstieg der Mitosehäufigkeit

während des Nachmittages zu verhindern. Daraus schließt er, daß der normale Proliferationsrhythmus durch die Ausschüttung der Corticosteroidhormone bestimmt wird und ein zusätzlicher Effekt durch das während körperlicher Anstrengung gebildete Adrenalin eintritt.

Die ersten histoautoradiographischen Untersuchungen zur Frage epidermaler Proliferationsschwankungen beim Menschen stammen von Kahn et al. (40). Sie bestimmten den ^3H -Index in der Abdominalepidermis von 7 Männern sowie 2 Frauen (Durchschnittsalter: 61 Jahre) nach intradermalen Injektionen von tritiummarkiertem Thymidin in sechsstündigen Abständen während des Zeitraumes von 6.00 Uhr bis 24.00 Uhr. Dabei ergab sich ein geringer, jedoch statistisch signifikanter Anstieg des durchschnittlichen ^3H -Indexes um Mitternacht.

Biopsisch gewonnene Abdominalhautproben von allerdings nur 3 hautgesunden Männern inkubierten Pullmann et al. (58) unter in-vitro-Bedingungen. Die für den Zeitraum von 0.00 Uhr bis 18.00 Uhr in sechsstündigen Abständen ermittelten ^3H -Indices zeigten keine statistisch gesicherten Schwankungen. (In derselben Arbeit wird ein Markierungsmaximum um 6.00 Uhr bei Versuchen an psoriatischer Epidermis beschrieben.)

Neuere histoautoradiographische Untersuchungen von Schell et al. (66) brachten folgendes Ergebnis: Alle an 5 hautgesunden Männern im Alter von 24 bis 37 Jahren unter in-vitro-Bedingungen ermittelten Parameter (^3H -Index der Basalzellkerne, markierte Basalzellkerne/100 μ Basalmembran sowie die Gesamtzahl markierter Zellkerne/100 μ Basalmembran) zeigten deutliche tageszeitliche Schwankungen. Dabei verliefen die Änderungen der proliferativen Aktivität in den basalen und suprabasalen Abschnitten der Epidermis gleich-

sinnig. Allerdings fanden sich die beobachteten Maxima und Minima der Markierung für jede Versuchsperson zu verschiedenen Zeitpunkten. Auch ließen die gefundenen Proliferationsschwankungen, insbesondere wegen der kurzen Versuchsdauer (24 Stunden), noch nicht den Schluß auf eine Rhythmik des Hautwachstums zu.

Eine vom selben Autor (67) parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführte weit aufwendigere Versuchsreihe ergab ebenfalls deutliche Proliferationsschwankungen von individuell unterschiedlicher Form. Die an 6 männlichen Freiwilligen durchgeführten in-vitro-Versuche erstreckten sich dabei erstmals über einen Zeitraum von 48 Stunden, wodurch ihre Aussagekraft im Vergleich zu den vorangehend zitierten Arbeiten wesentlich höher einzuschätzen ist. Simultan zu den Biopsiezeitpunkten durchgeführte Hormonbestimmungen zeigten bei 4 der 6 Versuchspersonen einen gegenüber dem Cortisolspiegel reziproken und zeitlich verschobenen Verlauf der Proliferationsschwankungen und sind somit indirekt ein Hinweis auf eine circadiane Rhythmik der epidermalen Proliferation beim Menschen.

D. ZUR FRAGE EINER TAGESZEITLICHEN KONSTANZ DER DNS-
SYNTHESEDAUER

I. Die Bedeutung dieser Frage für die Bewertung von
Schwankungen des Markierungsindex

Im Rahmen einer kritischen Betrachtung der soeben dargelegten Befunde über tageszeitliche Schwankungen des Mitose- bzw. ^3H -Indexes muß berücksichtigt werden, daß von einer "echten" Schwankung der Gesamtproliferation nur dann gesprochen werden kann, wenn die Längen der einzelnen Zellzyklusphasen nicht selbst Variationen größeren Ausmaßes unterliegen. Nur unter dieser Voraussetzung kann davon ausgegangen werden, daß die gefundenen unterschiedlichen Werte tatsächlich auf einem schwankenden Anteil der im Proliferativen Compartment (siehe S. 6) befindlichen Zellen an der Gesamtzellpopulation beruhen.

Die Größe des ^3H -Indexes wird durch die Zahl der Zellen bestimmt, die sich zum Untersuchungszeitpunkt gerade in der S-Phase befinden. Eine Zunahme dieses Wertes kann daher durch zwei verschiedene Mechanismen bewirkt werden:

1. Durch eine Zunahme der S-Phasenlänge:

Bei einer konstanten Eintrittsrate von Zellen aus der G_1 - in die S-Phase nimmt wegen des verzögerten Austrittes der Anteil der radioaktiv markierbaren Zellen an der Gesamtzahl zu.

2. Durch einen vermehrten Eintritt von Zellen in die S-Phase:

Hierbei kommt es auch bei konstanter S-Phasenlänge zu einer Zunahme des Anteiles markierbarer Zellen.

Theoretisch ist es natürlich auch denkbar, daß sowohl die S-Phasenlänge als auch die Eintrittsrate von Zellen in die S-Phase tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, so daß die gemessenen ^3H -Indices als Summationseffekte aufzufassen wären.

Direkte Schlüsse auf die Größe des Proliferativen Compartments sind anhand des Markierungsindex also nur dann zulässig, wenn von einer Konstanz der S-Phasenlänge im Tagesverlauf ausgegangen werden darf. Leider brachten die von verschiedenen Autoren zur Klärung dieser wichtigen Frage angestellten Untersuchungen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse.

II. Bereits vorliegende Befunde zur Frage tageszeitlicher Schwankungen der S-Phasenlänge

Beruhend auf zahlreichen, zumeist in Tierversuchen ermittelten Daten wird die S-Phasendauer heute größenordnungsmäßig mit 6 bis 8 Stunden angegeben. Wie in der von Schultze veröffentlichten Literaturzusammenstellung (74) zu sehen ist, gilt dies fast universell für die Vertreter der verschiedenen Species sowie die unterschiedlichsten Gewebearten. Speziell dieser Thematik gewidmete Untersuchungen bestätigen diesen Befund (55, 13). Jedoch sind auch Ausnahmen bekannt, auf die bereits hingewiesen wurde (siehe S. 21). Mit Hilfe der verschiedenen zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden kommen einige Autoren zu dem Schluß, daß diese relative Konstanz der S-Phasenlänge auch im Tagesverlauf bestehen bleibt.

So ermittelten Pilgrim und Maurer sowie Brown und Berry in ihren Untersuchungen an verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte (55) bzw. an der Wangenschleimhaut des Hamsters (4) zu allen Zeitpunkten gleiche Werte für die mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern.

In der Arbeit von Grube et al. (31) kam eine modifizierte Doppelmarkierungsmethode zur Anwendung, die sowohl eine Bestimmung der Eintrittsrate von Zellen in die S-Phase als auch der Austrittsrate ermöglichte. Hierbei fanden sich an der Mäuseepidermis ausgeprägte tageszeitliche Schwankungen der Eintrittsrate, denen jeweils nach Ablauf eines konstanten, der S-Phasenlänge entsprechenden Zeitraumes gleichsinnige Schwankungen der Austrittsrate folgten. Daraus schlossen Grube et al., daß die Variationen des Markierungsindex alleine auf die unterschiedliche Zahl in die S-Phase eintretender Zellen zurückzuführen ist, während die S-Phasendauer konstant bleibt.

Izquierdo und Gibbs (38) untersuchten ebenfalls die Wangenschleimhaut des Hamsters hinsichtlich tageszeitlicher Schwankungen der DNS-Synthese sowie der mitotischen Aktivität. In diesem Rahmen durchgeführte Bestimmungen der S-Phasenlänge mittels der Methode markierter Mitosen ergaben einen im Tagesverlauf konstanten Wert von 8 Stunden.

Im Widerspruch zu den bisher beschriebenen Befunden stehen Veröffentlichungen verschiedener Autoren, die auf circadiane Schwankungen der DNS-Synthesedauer hinweisen.

Neben anderen Proliferationsdaten bestimmten Chiakulas und Scheving (14) an der Epidermis von Salamandern sowie Scheving und Pauly (70) am Corneaeepithel von Ratten die mittlere Silberkornzahl/markiertem Zellkern zu verschiedenen Tageszeiten. Die in beiden Fällen gefundenen deutlichen Variationen der Ergebnisse werteten sie als Änderungen der DNS-Syntheserate und damit der S-Phasendauer.

Mit einer speziellen autoradiographischen Methode untersuchte Tvermyr (76) die Epidermis haarloser Mäuse hinsichtlich circadianer Rhythmen der DNS-Synthese: Zu jeder Stunde des

Tages und der Nacht injizierte sie verschiedenen Tieren ^3H -Thymidin. Einigen Mäusen verabfolgte sie die gleiche Dosis der markierten Verbindung ein zweites Mal in einem dreistündigen Abstand zur ersten Injektion. Dieses Vorgehen ermöglichte ihr sowohl die Bestimmung des Markierungsindex als auch die Berechnung der Eintrittsrate von Zellen in die Synthesephase sowie deren Austrittsrate pro Stunde. Zur Ermittlung der S-Phasenlänge addierte sie die Austrittsrate von einem Zeitpunkt t ab solange auf, bis die Summe dem um t Uhr gefundenen Markierungsindex entsprach. Auf diese Weise bestimmte sie Werte, die im Bereich von 5 Stunden (für den Zeitraum von 7.00 Uhr bis 10.00 Uhr) bis 12 Stunden (10.00 Uhr bis 13.00 Uhr) schwankten. Da sie neben diesen Variationen der S-Phasendauer auch Schwankungen der Eintrittsrate fand, deutete sie die Änderungen des ^3H -Indexes als Kombinationseffekt beider Vorgänge.

Über den tageszeitlichen Verlauf der DNS-Synthesedauer gesunder menschlicher Epidermis liegen bislang nur die in der Arbeit von Pullmann et al. (58) veröffentlichten Ergebnisse vor. Diese wurden an 3 männlichen Freiwilligen ermittelt und zeigten bei einem Durchschnittswert von 6,6 Stunden keine statistisch gesicherten Schwankungen. Die Aussagekraft dieser Werte wird jedoch durch die geringe Anzahl von Versuchspersonen und die Tatsache, daß pro Zeitpunkt jeweils nur ein Wert bestimmt wurde, eingeschränkt.

Die Seltenheit experimenteller Befunde über die DNS-Synthesedauer menschlicher Zellen zu verschiedenen Tageszeiten ist wohl durch methodische Schwierigkeiten begründet. Diese dokumentieren sich auch in den zum Teil erheblichen Abweichungen der von verschiedenen Autoren für die menschliche Epidermis ermittelten Dauer der DNS-Synthesephase. Wie eine von Gelfant (29) veröffentlichte Literaturzusammenstellung zeigt, wurden im Rahmen verschiedener, zur Frage der gestörten Proliferation bei Psoriasis vulgaris durchgeführter Untersuchungen für die gesunde Haut Werte im Bereich von 5,9 bis 16 Stunden gefunden.

E. FRAGESTELLUNG

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes mit dem Thema "Vergleichende zellkinetische und chronobiologische Untersuchungen zur Orthologie und Pathologie rhythmischer epidermaler Proliferationsschwankungen und ihrer endogenen Steuerung beim Menschen" (Ho 195/12) an der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen durchgeführt.

Das genannte Projekt schließt sich an eine tierexperimentelle (65) sowie an eine an menschlicher Epidermis durchgeführte Untersuchung (66) zur Frage epidermaler Proliferationsschwankungen an. In beiden Arbeiten sowie in einer parallel zur vorliegenden durchgeführten Versuchsreihe (67) fanden sich, wie schon vorangehend ausgeführt, deutliche Variationen des ^3H -Indexes im Tagesverlauf. Für die Interpretation dieser sowie gleichartiger, in der Literatur beschriebener Ergebnisse ist die Klärung der Frage einer tageszeitlichen Konstanz der S-Phasenlänge bzw. deren Schwankungen von entscheidender Bedeutung. Erst nach ihrer Beantwortung sind Rückschlüsse auf die Größe des Proliferativen Compartments und deren Veränderungen im Tagesverlauf möglich. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, brachten diesbezügliche Untersuchungen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist daher, die Klärung dieser wichtigen Frage, soweit sie die gesunde menschliche Epidermis betrifft, voranzutreiben.

Darüberhinaus ergeben sich Fragen, die in der Problematik der bei der Untersuchung menschlichen Gewebes anzuwendenden autoradiographischen in-vitro-Methoden begründet sind. Hinweise auf störende Einflüsse der Inkubationsbedingungen bei der Bestimmung der S-Phasenlänge unter in-vitro-Bedingungen brachte eine ebenfalls an der hiesigen Klinik durchgeführte tierexperimentelle Untersuchung (73).

Schließlich kann auch die Frage der durchschnittlichen Dauer der DNS-Synthesephase der menschlichen Epidermis noch nicht als geklärt gelten, wie die zum Teil stark divergierenden Angaben in der Literatur zeigen.

In der vorliegenden Arbeit werden daher im einzelnen folgende Fragen geprüft:

1. Ist eine Bestimmung der DNS-Synthesedauer der menschlichen Epidermis durch Anwendung der Doppelmarkierungsmethode mit ^{14}C - und ^3H -Thymidin unter in-vitro-Bedingungen bei Einhaltung optimaler Inkubationsbedingungen möglich?
2. Welcher Wert ergibt sich hierbei für die durchschnittliche DNS-Synthesedauer menschlicher Epidermis?
3. Unterliegt die DNS-Synthesedauer menschlicher Epidermis tageszeitlichen Schwankungen?
4. Wie lassen sich die gefundenen Ergebnisse, auch im Vergleich zur vorhandenen Literatur, interpretieren?

F. MATERIAL UND METHODE

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden im Zeitraum von November 1976 bis März 1977 an der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen durchgeführt. Dabei kam eine in-vitro-Doppelmarkierungsmethode zur Bestimmung der S-Phasenlänge menschlicher Epidermis zur Anwendung. Auf die theoretischen Grundlagen dieser Methode wurde bereits eingegangen (siehe S. 16 ff.), so daß im folgenden nur die speziellen Versuchsbedingungen beschrieben werden müssen.

I. Die Versuchspersonen

Zur Entnahme der Hautbiopsien für die vorliegende sowie eine parallel durchgeführte Versuchsreihe (67) standen uns 6 Versuchspersonen freiwillig zur Verfügung. Bei der Auswahl der Probanden wurden bestimmte Kriterien beachtet:

Wegen der bei Frauen zyklusbedingten Schwankungen im Hormonhaushalt und deren möglichen Auswirkungen auf die Proliferationskinetik wurden die Untersuchungen ausschließlich an Männern durchgeführt. Hinsichtlich der Altersverteilung achteten wir auf eine möglichst geringe Streubreite (20 bis 25 Jahre). Anhand eines zu diesem Zweck entworfenen Anamnesebogens wurden weitere Daten ermittelt: Insbesondere wurde für den Untersuchungszeitpunkt sowie den unmittelbar vorangehenden Zeitraum das Vorliegen von Hautkrankheiten und anderer Systemerkrankungen ausgeschlossen. Einheitlichkeit wurde auch hinsichtlich der Lebensgewohnheiten angestrebt. Die Versuchspersonen waren ausnahmslos Studenten (bis auf eine Ausnahme Medizinstudenten). Wegen der möglichen Auswirkungen von Stressfaktoren achteten wir darauf, daß keine besonderen physischen oder psychischen Belastungen vorlagen (Ausschluß extremer

Schlafgewohnheiten, keine Nachtarbeit, keine bevorstehenden Prüfungen, kein Genußmittelabusus, keine Medikamenteneinnahme).

Während des Untersuchungszeitraumes von 48 Stunden waren die Probanden tagsüber nur zu den Biopsiezeitpunkten an die Klinik gebunden, so daß ein normaler Lebensrhythmus weitgehend eingehalten werden konnte. Nachts erfolgte die Unterbringung in Einzelzimmern, Über ihre Tätigkeiten sowie Zeitpunkt und Art der Mahlzeiten führten die Versuchspersonen ein Protokoll.

II. Entnahme der Biopsien

Während des 48stündigen Versuchszeitraumes wurden zu insgesamt 9 Zeitpunkten in 6stündigem Abstand jeweils 4 Hautproben von der linken Oberarminnenseite entnommen. Die erste und letzte Biopsie erfolgte jeweils um 12.00 Uhr. Entnahmezeitpunkte waren also: 12.00 Uhr, 18.00 Uhr, 24.00 Uhr sowie 6.00 Uhr.

Nach Desinfektion der Haut mit Kodan^R-Lösung wurden die Excisionen unter Lokalanästhesie mit Scandicain^R sine Supra-
renin mittels Einmalhautstanzen von 3 bzw. 4 mm Durchmesser durchgeführt. Dabei wurde zu den Entnahmestellen des jeweils vorangegangenen Zeitpunktes ein Mindestabstand von 1 cm gewahrt.

Unmittelbar nach der Biopsie wurden die Hautproben in ein Röhrchen mit vorgewärmtem inaktiven Nähmedium gegeben und sofort zur Inkubation in das Autoradiographische Labor transportiert.

Vom Zeitpunkt der Entnahme bis zum Beginn der Inkubation

vergingen durchschnittlich 5 bis 6 Minuten. Zwei der jeweils vier entnommenen Hautstückchen dienten der Ermittlung der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse.

III. Die Inkubation

Die radioaktive Markierung der entnommenen Hautproben erfolgte in einem von Dr. med. Hans Rosenberger an der hiesigen Klinik in Zusammenarbeit mit dem Biomedizinischen Department der Universität Erlangen-Nürnberg entwickelten Inkubator. Dieses Gerät enthält 3 Inkubationskammern, die über Druckschläuche mit einer Sauerstoffflasche in Verbindung stehen. Durch regelbare Einlaßventile läßt sich in den Kammern unabhängig voneinander eine konstante Sauerstoffüberdruckatmosphäre herstellen, dessen Druckwert (atm) an geeichten Präzisionsmanometern abgelesen werden kann. Als Überdruckventile konstruierte Auslaßventile verhindern ein Übersteigen des gewünschten Druckes und ermöglichen schließlich den Druckausgleich vor dem Öffnen der Apparatur. Ein die Inkubationskammern umgebendes Wasserbad hält das radioaktive Nährmedium auf der gewünschten Temperatur.

Als Nährmedium für die Inkubation der Hautstückchen, das Auswaschen zwischen den beiden Markierungen sowie den Transport in das Autoradiographische Labor diente Minimum Essential Medium with Earle's Salts and Hepes-Puffer. Für die Doppelmarkierung stellten wir zwei Arten von Inkubationslösungen durch Zusatz radioaktiv markierten Thymidins (Hersteller: Amerham Buhler, Braunschweig) her:

1. ^{14}C -Thymidin mit einer Aktivität von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ Inkubationslösung.
2. ^3H -Thymidin mit einer Aktivität von 10 $\mu\text{Ci/ml}$ Inkubationslösung (Versuch I) bzw. 5 $\mu\text{Ci/ml}$ Inkubationslösung (Versuch II - VI).

Wie Vorversuche ergeben hatten, sind die geringsten methodischen Schwankungen des Markierungsindex bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von $+32^{\circ}\text{C}$ zu erwarten (67). Wir führten daher auch die hier beschriebenen Doppelmarkierungsversuche bei dieser Temperatur durch. Jeweils 4 Stunden vor Beginn der Versuchsreihe wurde das Wasserbad des Inkubators auf 32°C eingestellt und das Erreichen der Temperatur mit einem elektrischen Thermometer überprüft. Eine Stunde vor dem Zeitpunkt der Biopsie entnahmen wir unter sterilen Bedingungen sowohl das inaktive Nährmedium als auch jeweils 5 ml der beiden Inkubationslösungen den im Kühlschrank befindlichen Flaschen. In einem gesonderten Wasserbad wurde nun das inaktive Medium sowie das für die zweite Markierung vorgesehene ^3H -Thymidin in verschlossenen Reagenzgläsern auf 32°C vorgewärmt. Das für die erste Markierung verwendete ^{14}C -Thymidin wurde sogleich in das Inkubationsgefäß und dieses in die Inkubationskammer des Gerätes gestellt und somit ebenfalls auf die gewünschte Temperatur gebracht.

Der Ablauf der Inkubation gestaltete sich nun folgendermaßen: Sofort nach der Ankunft im Autoradiographischen Labor wurden die beiden Hautstückchen unmittelbar aus dem Transportmedium in das Inkubationsgefäß, das 5 ml der ^{14}C -Thymidin-Lösung enthielt, gegeben. Dieses wurde nun in die Inkubationskammer gestellt, welche verschlossen und mit einem O_2 -Überdruck versehen wurde. Durch anfängliches Öffnen des Auslaßventiles für ca. 20 Sekunden wurde in der Kammer eine reine Sauerstoffatmosphäre hergestellt (resultierender O_2 -Partialdruck: 2,2 atm = 222915 Pa).

Nach 40minütiger Inkubation in ^{14}C -Thymidin nahmen wir das Inkubationsgefäß auf dem Gerät. Es folgte ein dreimaliges Auswaschen der Hautstückchen in jeweils 5 ml inaktivem Medium, das ebenfalls auf 32°C vorgewärmt worden war. Dieser Vorgang nahm insgesamt 5 Minuten in Anspruch.

Sofort anschließend wurden die Biopsiestückchen, wiederum gemeinsam, in ein neues Inkubationsgefäß gegeben, das nun 5 ml der ^3H -Thymidin-Lösung enthielt. Das Beschicken des Inkubators erfolgte analog dem oben beschriebenen Vorgehen. Nach 40minütiger Inkubation in ^3H -Thymidin wurden die Hautproben schließlich durch Einbringen in Fixationslösung nach Carnoy (60 % absoluter Alkohol, 30 % Chloroform, 10 % Eisessig) abgetötet.

Somit ergab sich, vom Zeitpunkt der Entnahme an gerechnet, eine Versuchsdauer von ca. 90 Minuten (ca. 5 Minuten Transport, 40 Minuten 1. Inkubation, 5 Minuten Auswaschen, 40 Minuten 2. Inkubation).

IV. Die histoautoradiographische Weiterverarbeitung

Nach Beendigung der Fixierung folgte zunächst die übliche histologische Bearbeitung der Biopsieproben: Entwässern (in 100 %igem Isopropanol), "Entspriten" (in Methylbenzoat, Benzol, Benzol-Paraffin und Paraffin) und schließlich Einbetten in Histoplast^R.

Von jedem Hautstückchen wurden senkrecht zur Epidermisoberfläche ca. 100 Serienschnitte mit einer Dicke von je 4 μ angefertigt. Somit kam jeweils nur ein Randbereich von ca. 400 μ zur Verarbeitung, also ein Bezirk, der unter den gewählten Überdruckbedingungen eine durchgehende Markierung erwarten ließ. Jeweils 30 bis 40 dieser Schnitte wurden in fortlaufender Reihenfolge auf einen mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen.

Nach der Entparaffinierung in Xylol, Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe vom Isopropanol bis zum Aqua dest., wurden die Präparate mit einem Stripping-Film AR 10 (Hersteller:

Kodak) überzogen und für 14 Tage in der Dunkelkammer exponiert. Anschließend folgten die photographische Entwicklung und Fixierung des Filmes. Schließlich wurden die Schnitte mit saurem Hämalaun nach Mayer durch den Film hindurch gefärbt, in leicht fließendem Wasser gebläut und, nach Lufttrocknung, mit Eukitt eingedeckt.

V. Die Auswertung der Autoradiogramme

Die Auswertung der so angefertigten Histoautoradiogramme erfolgte an einem binokularen Mikroskop der Firma Zeiss unter Öl-Immersion bei 1000facher Vergrößerung.

Vor Beginn der Auswertung war es jedoch notwendig, Kriterien zu erarbeiten, die eine Untersuchung rein ^3H -markierter Zellkerne von ^{14}C -markierten Kernen (mit und ohne ^3H) ermöglichten. Zu diesem Zweck waren den Versuchspersonen II und III jeweils am Ende der Versuchsreihe eine zusätzliche Hautbiopsie entnommen worden, welche mit den regulär entnommenen Biopsieproben nur eine ^{14}C -Markierung erhielten und nicht mit ^3H -Thymidin markiert wurden. Wir erhielten somit Präparate mit einer reinen ^{14}C -Markierung. Diese verglichen wir mit bereits vorhandenen Präparaten, die zur Ermittlung des Markierungsindex eine reine ^3H -Markierung erhalten hatten. Wie sich zeigte, ließen sich beide Markierungsarten anhand folgender Kriterien, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind (1), recht gut unterscheiden: Als rein ^3H -markiert bezeichneten wir Zellen, deren Markierung sich feinkörnig, streng auf die Fläche des Kernes begrenzt, darstellte. Als ^{14}C -markiert betrachteten wir Zellen, deren Markierung weit über den Kern hinaus reichte, grobschollig war und zum Teil als "Bahnpuren" imponierte.

Die wenigen markierten Zellen, die mit Hilfe der genannten

Kriterien nicht einzuordnen waren, ließen wir bei der Auswertung unberücksichtigt, um Fehlinterpretationen weitgehend zu vermeiden.

Für jedes einzelne der zu den verschiedenen Zeitpunkten entnommene Hautstückchen wurde die Dauer der DNS-Synthesephase folgendermaßen ermittelt: An jedem dritten der insgesamt ca. 100 Schnitte wurde mit Hilfe einer Strichliste mikroskopisch die Zahl der rein ^3H -markierten Zellen sowie die Zahl der ^{14}C -markierten Zellen (mit und ohne ^3H -Markierung) gezählt. Dabei wurden ausnahmslos alle auswertbaren markierten Kerne, also sowohl die basal als auch die suprabasal gelegenen, berücksichtigt. Durch das Auslassen jeweils zweier Schnitte bei der Auswertung sollte die mehrfache Erfassung einer markierten Zelle vermieden werden. Durch Aufsummierung der für die einzelnen Schnitte ermittelten Werte erhielten wir für die beiden Markierungsarten je einen Gesamtwert. Zur Berechnung der S-Phasenlänge (t_S) wurden die beiden Zahlen in die folgende Formel (siehe auch S. 19) eingesetzt:

$$t_S \text{ (Std.)} = \frac{\text{Zahl der } ^{14}\text{C-Kerne (mit und ohne } ^3\text{H}) \times 40}{\text{Zahl der } ^3\text{H-Kerne} \times 60}$$

40 = Δt in Minuten

60 = zur Umrechnung der t_S von Minuten in Stunden

Der so für jedes Hautstückchen ermittelte Wert basiert auf der Auswertung von durchschnittlich 600 bis 700 markierten Zellkernen. Da zu jedem Untersuchungszeitpunkt zwei Biopsien durchgeführt wurden, erhielten wir je zwei Werte und einen aus diesen berechneten Mittelwert.

G. ERGEBNISSE

Von den insgesamt 108 entnommenen Hautstückchen und den davon angefertigten Histoautoradiogrammen konnten 102 ausgewertet werden. Alle Schnitte dieser Präparate waren durchgehend und gleichmäßig markiert. Mit Hilfe der oben beschriebenen Kriterien ließen sich ^{14}C - und ^3H -markierte Zellen unterscheiden.

Die Tatsache, daß rein ^3H -markierte Zellen auftraten, spricht dafür, daß unter den gewählten in-vitro-Versuchsbedingungen auch während der zweiten Inkubation noch Zellen neu in die S-Phase eintraten. Somit war eine Berechnung der S-Phasenlänge möglich.

Für zwei Zeitpunkte des Versuches I konnte jedoch keine Auswertung erfolgen, da die Autoradiogramme dieser Biopsien nur rein ^{14}C -markierte Zellen zeigten (fehlende Werte in Tab. 1). Vermutlich enthielt die zweite Inkubationslösung kein ^3H -Thymidin. Ebenso mußte wegen eines technischen Fehlers am Inkubator auf die Werte des zum letzten Biopsiezeitpunkt von Versuch II gewonnenen Materials verzichtet werden (fehlende Werte in Tab. 2).

Für alle anderen Biopsiezeitpunkte wurden jeweils, entsprechend den beiden gleichzeitig entnommenen Hautproben, zwei Werte für die Dauer der DNS-Synthesephase ermittelt. Zur Abschätzung des methodischen Fehlers berechneten wir die durchschnittliche Abweichung dieser beiden pro Entnahmezeitpunkt ermittelten Ergebnisse. Diese betrug 0,22 Stunden (größter gefundener Unterschied: 0,75 Stunden, geringster Unterschied: 0,02 Stunden).

Als Mittelwert aus den Einzelergebnissen aller sechs Versuche berechneten wir eine mittlere S-Phasenlänge von 6,20 Stunden (siehe Tab. 8).

Zur Klärung dieser Frage möglicher tageszeitlicher Variationen der DNS-Synthesedauer dienten die folgenden Untersuchungen: Zur Ermittlung möglicher Maxima bzw. Minima berechneten wir die Mittelwerte aus allen für einen Biopsiezeitpunkt bestimmten Einzelwerten (siehe Tab. 7 und 8). Der geringste Mittelwert ergab sich hierbei für den Zeitpunkt 12.00 Uhr (5,92 Stunden), während der höchste für 24.00 Uhr (6,43 Stunden) gefunden wurde. Dieser geringgradige Unterschied läßt sich graphisch durch die sogenannte "Superposition" (siehe Abb. 9) verdeutlichen, wobei die Summenwerte aus den pro Zeitpunkt bestimmten Einzelwerten gegen die Abszisse aufgetragen wurden.

Die statistische Auswertung unserer Ergebnisse erfolgte zum einen mit dem t-Test, wobei sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ergab, daß die gefundenen Werte sich weder bei den einzelnen Versuchspersonen noch in ihrer Gesamtheit signifikant voneinander unterscheiden. Zum anderen kam ein in der Rhythmusforschung entwickeltes Verfahren, das sogenannte Varianz- oder Power-Spektrum zur Anwendung. Dieses ermöglicht mit Hilfe eines Computers die Feststellung von Periodizitäten in sogenannten "Zeitreihen", wobei diese von Meßpunkt zu Meßpunkt gegen sich selbst verschoben werden. Für jeden Meßpunkt wird hierbei der Grad der Übereinstimmung als sogenannter "Autokorellationskoeffizient" bestimmt (Lit. bei 67). Mit dieser Methode ließ sich in den von uns gefundenen Zeitreihen keine statistisch signifikante Rhythmie nachweisen.

Dies bedeutet: Nach den vorliegenden Ergebnissen zeigt die S-Phasenlänge der menschlichen Epidermis im Tagesverlauf eine relative Konstanz.

Erläuterung der Tabellen:

Die Tabellen 1 bis 6 enthalten, jede für einen Versuch, folgende Informationen:

- t_S : Die für jedes einzelne der im betreffenden Versuch entnommenen Hautstückchen bestimmten Werte für die S-Phasenlänge, also pro Entnahmezeitpunkt zwei Werte;
- $\bar{t}_S$: die Mittelwerte aus den für die beiden jeweils gleichzeitig entnommenen Hautproben berechneten Ergebnissen;
- $\bar{\bar{t}}_S$: die Mittelwerte aus allen für die gleiche Tageszeit ermittelten Werte (also aus allen 12.00 Uhr-Werten, allen 18.00 Uhr-Werten usw.);
s = Standardabweichung
n = Anzahl der zugrunde liegenden Einzelwerte;
- den Gesamtmittelwert aus allen für den entsprechenden Versuch bestimmten Einzelwerten, mit Standardabweichung (s) und Anzahl der Einzelwerte (n).

Die Tabellen 7 und 8 stellen eine Zusammenfassung aller sechs Versuche dar (Erläuterung in der jeweiligen Legende).

Erläuterung der Kurven:

Zur Veranschaulichung der in den Tabellen aufgeführten Ergebnisse zeigen die Abbildungen 3 bis 8, wiederum jede für einen Versuch:

- Als Säulendarstellung den Gesamtmittelwert aus allen Einzelwerten mit dem Bereich der Standardabweichung ($\pm s$);
- als durchgezogene Linie den Verlauf der in den Tabellen als $\bar{t}_S$ bezeichneten Werte;
- als gestrichelte Linie den Verlauf der in den Tabellen als $\bar{\bar{t}}_S$ bezeichneten Werte.

Abbildung 9 zeigt als Zusammenfassung aller sechs Versuche über den 48stündigen Versuchszeitraum in ihrem unteren Teil die in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse mit den jeweiligen Bereichen der Standardabweichung ($\pm s$). In ihrem oberen Teil wurde die sogenannte "Superposition" (siehe S. 40) dargestellt.

Abbildung 10 zeigt als Zusammenfassung aller sechs Versuche die in Tabelle 8 aufgeführten Ergebnisse in Säulendarstellungen mit den jeweiligen Bereichen der Standardabweichung ($\pm s$);
 n = Anzahl der jeweils zugrunde liegenden Werte.

Tabelle 1: Versuch I

Zeitpunkt	t_S (Std.)	$\bar{t}_S$ (Std.)	$\bar{\bar{t}}_S$ (Std.)	s	n
12.00	5,70 5,46	5,58	5,62	0,339	6
18.00	7,18 6,53	6,86	6,61	0,385	4
24.00	7,78 7,19	7,49	7,49	0,417	2
6.00	- -	-	6,72	0,191	2
12.00	5,31 5,25	5,28	Gesamt- mittelwert = 6,33 Std. s = 0,760 n = 14		
18.00	6,42 6,33	6,38			
24.00	- -	-			
6.00	6,85 6,58	6,72			
12.00	5,96 6,06	6,01			

Tabelle 2: Versuch II

Zeitpunkt	t_S (Std.)	$\bar{t}_S$ (Std.)	$\bar{\bar{t}}_S$ (Std.)	s	n
12.00	6,89 6,75	6,82	6,29	0,627	4
18.00	6,81 6,92	6,87	6,50	0,425	4
24.00	6,16 6,91	6,54	6,21	0,241	4
6.00	6,41 6,54	6,48	5,97	0,583	4
12.00	5,89 5,62	5,76	Gesamt- mittelwert = 6,27 Std. s = 0,509 n = 16		
18.00	6,10 6,17	6,14			
24.00	5,89 6,38	6,14			
6.00	5,50 5,44	5,47			
12.00	- -	-			

Tabelle 3: Versuch III

Zeitpunkt	t_S (Std.)	$\bar{t}_S$ (Std.)	$\bar{\bar{t}}_S$ (Std.)	s	n
12.00	5,91 6,14	6,03	6,09	0,288	6
18.00	6,05 5,75	5,90	6,09	0,253	4
24.00	6,21 5,82	6,02	6,54	0,631	4
6.00	5,81 5,97	5,89	6,14	0,294	4
12.00	6,30 6,41	6,36	Gesamt- mittelwert = 6,20 Std.		
18.00	6,24 6,32	6,28			
24.00	6,92 7,19	7,06			
6.00	6,44 6,32	6,38			
12.00	5,61 6,15	5,88			

Tabelle 4: Versuch IV

Zeitpunkt	t_S (Std.)	$\bar{t}_S$ (Std.)	$\bar{\bar{t}}_S$ (Std.)	s	n
12.00	6,26 6,13	6,20	5,86	0,282	6
18.00	6,19 6,13	6,16	6,10	0,172	4
24.00	6,64 6,62	6,63	6,31	0,379	4
6.00	6,48 6,31	6,40	6,27	0,173	4
12.00	5,70 5,52	5,61	Gesamt- mittelwert = 6,10 Std. s = 0,311 n = 18		
18.00	5,85 6,23	6,04			
24.00	5,89 6,09	5,99			
6.00	6,07 6,21	6,14			
12.00	5,83 5,71	5,77			

Tabelle 5: Versuch V

Zeitpunkt	t_S (Std.)	$\bar{t}_S$ (Std.)	$\bar{\bar{t}}_S$ (Std.)	s	n
12.00	6,52 6,42	6,47	6,05	0,435	6
18.00	6,85 7,13	6,99	6,55	0,524	4
24.00	6,57 6,39	6,48	6,34	0,262	4
6.00	6,85 7,04	6,95	6,22	0,844	4
12.00	6,14 6,19	6,17	Gesamt- mittelwert = 6,26 Std. s = 0,528 n = 18		
18.00	6,21 6,02	6,12			
24.00	5,96 6,42	6,19			
6.00	5,38 5,62	5,50			
12.00	5,46 5,59	5,53			

Tabelle 6: Versuch VI

Zeitpunkt	t_S (Std.)	$\bar{t}_S$ (Std.)	$\bar{\bar{t}}_S$ (Std.)	s	n
12.00	6,01 5,88	5,95	5,73	0,277	6
18.00	6,34 6,38	6,36	6,20	0,222	4
24.00	6,16 6,06	6,11	6,13	0,056	4
6.00	6,69 7,03	6,86	6,33	0,628	4
12.00	5,99 5,62	5,81	Gesamt- mittelwert = 6,06 Std. s = 0,403 n = 18		
18.00	6,18 5,89	6,04			
24.00	6,12 6,19	6,16			
6.00	5,73 5,88	5,81			
12.00	5,60 5,30	5,45			

Tabelle 7: Zusammenfassung der Werte aus allen sechs Versuchen über den 48stündigen Versuchszeitraum.

(s = Standardabweichung der zugrunde liegenden Werte,
n = Anzahl der zugrunde liegenden Einzelwerte)

Zeitpunkt	S-Phase (Std.)	s	n
12.00	6,17	0,421	12
18.00	6,52	0,456	12
24.00	6,54	0,546	12
6.00	6,51	0,413	10
12.00	5,83	0,384	12
18.00	6,16	0,173	12
24.00	6,31	0,439	10
6.00	6,00	0,485	12
12.00	5,73	0,270	10

Tabelle 8: Zusammenfassung der Werte aus allen sechs Versuchen, aufgeschlüsselt nach den vier Biopsiezeitpunkten sowie Gesamtmittelwert aus allen Einzelergebnissen.

(s = Standardabweichung der zugrunde liegenden Werte,
n = Anzahl der zugrunde liegenden Einzelwerte)

Zeitpunkt	S-Phase (Std.)	s	n
12.00	5,92	0,407	34
18.00	6,34	0,384	24
24.00	6,34	0,504	22
6.00	6,29	0,459	22
Ges.-Mittelw.	6,20	0,489	102

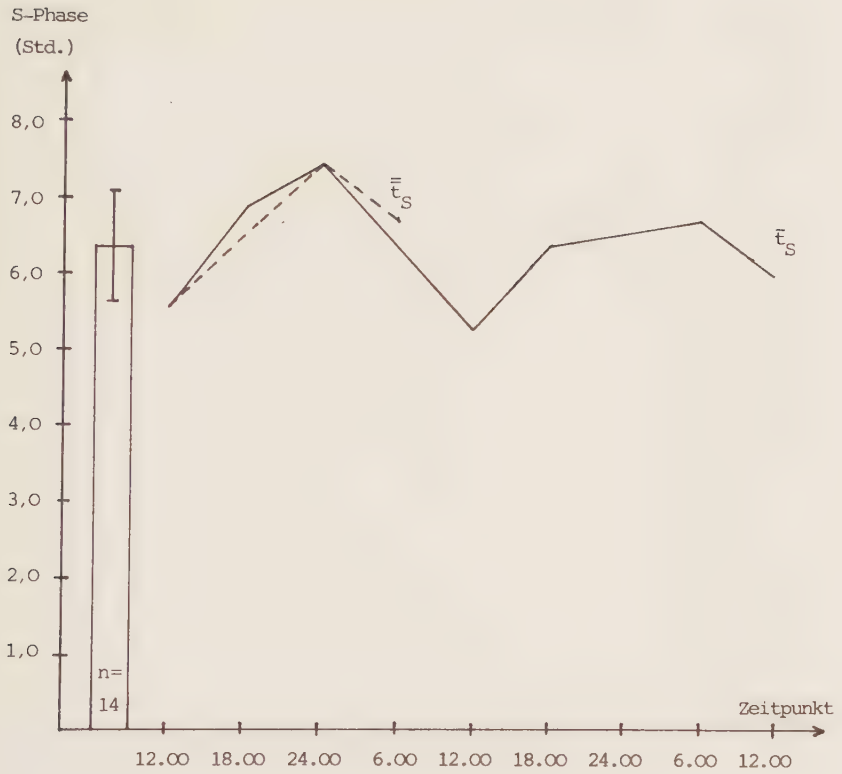


Abb. 3 Versuch 1

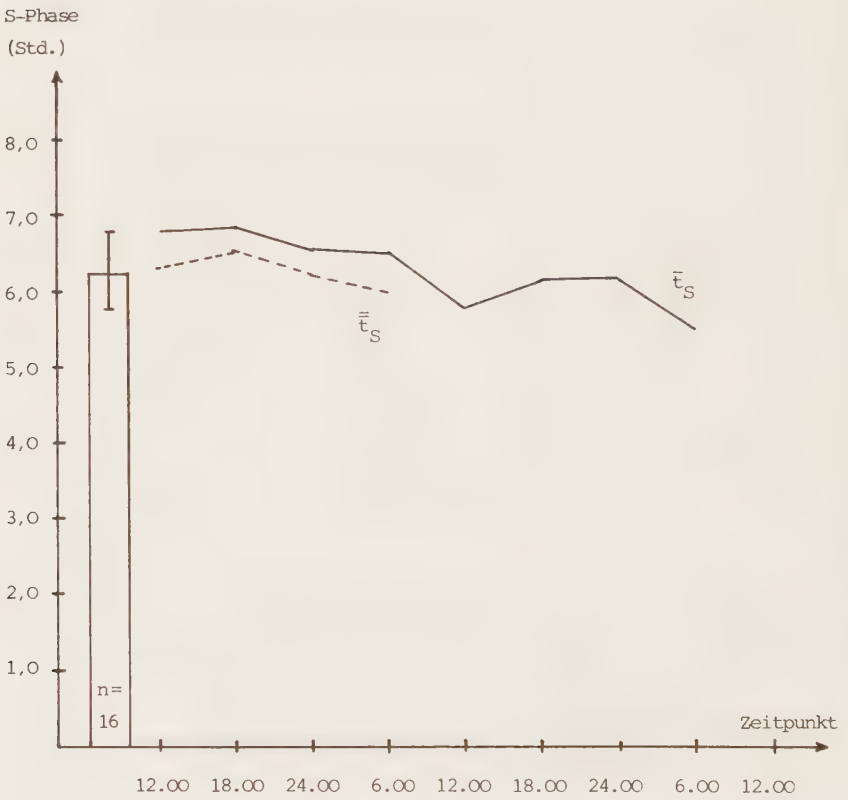


Abb. 4 Versuch II

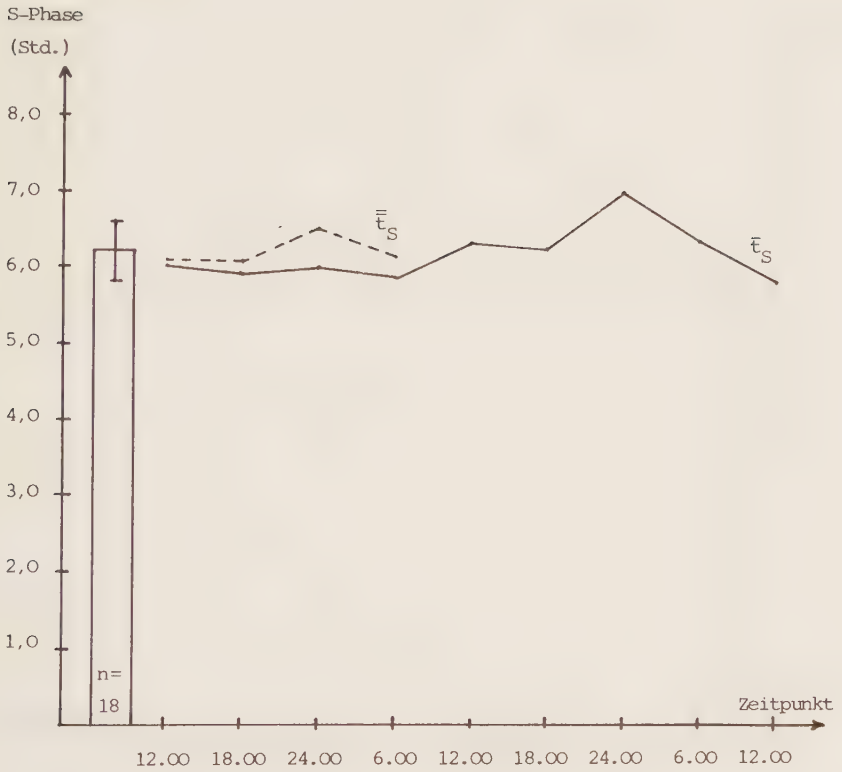


Abb. 5 Versuch III

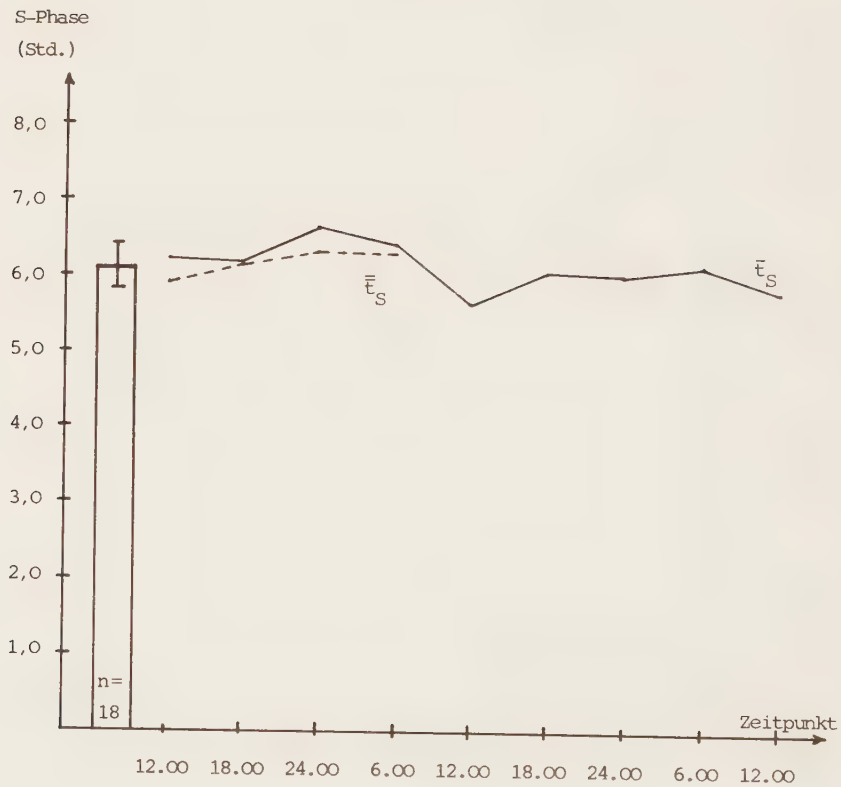


Abb. 6 Versuch IV

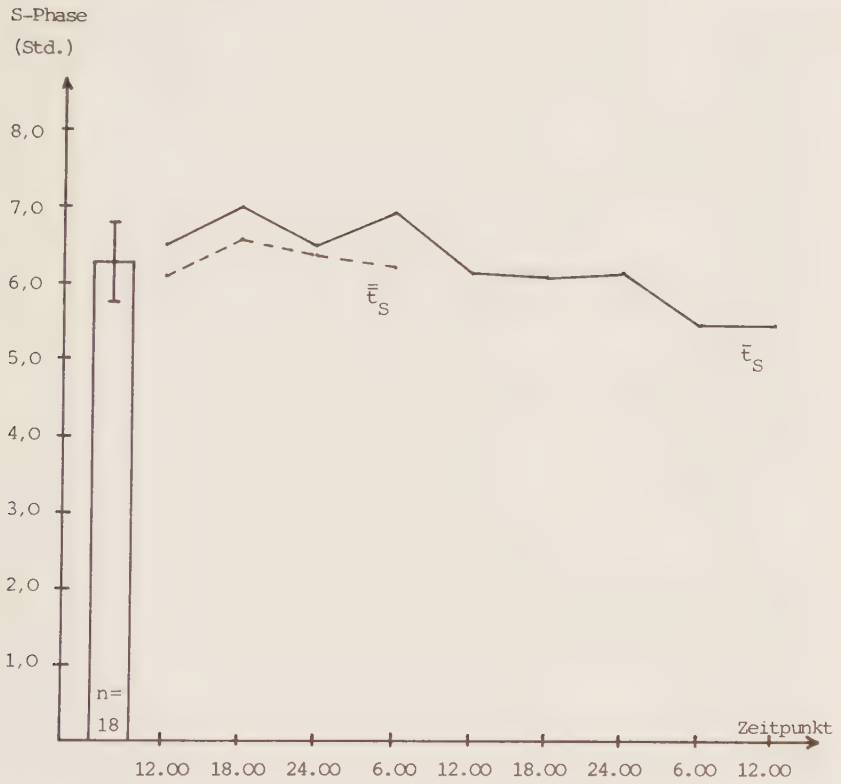


Abb. 7 Versuch V

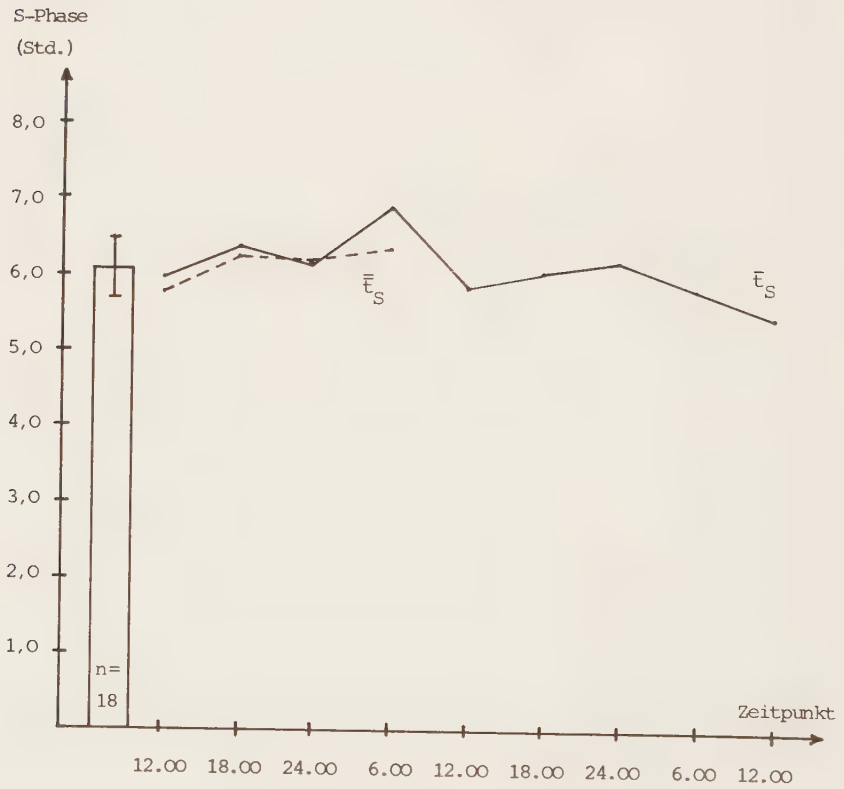


Abb. 8 Versuch VI

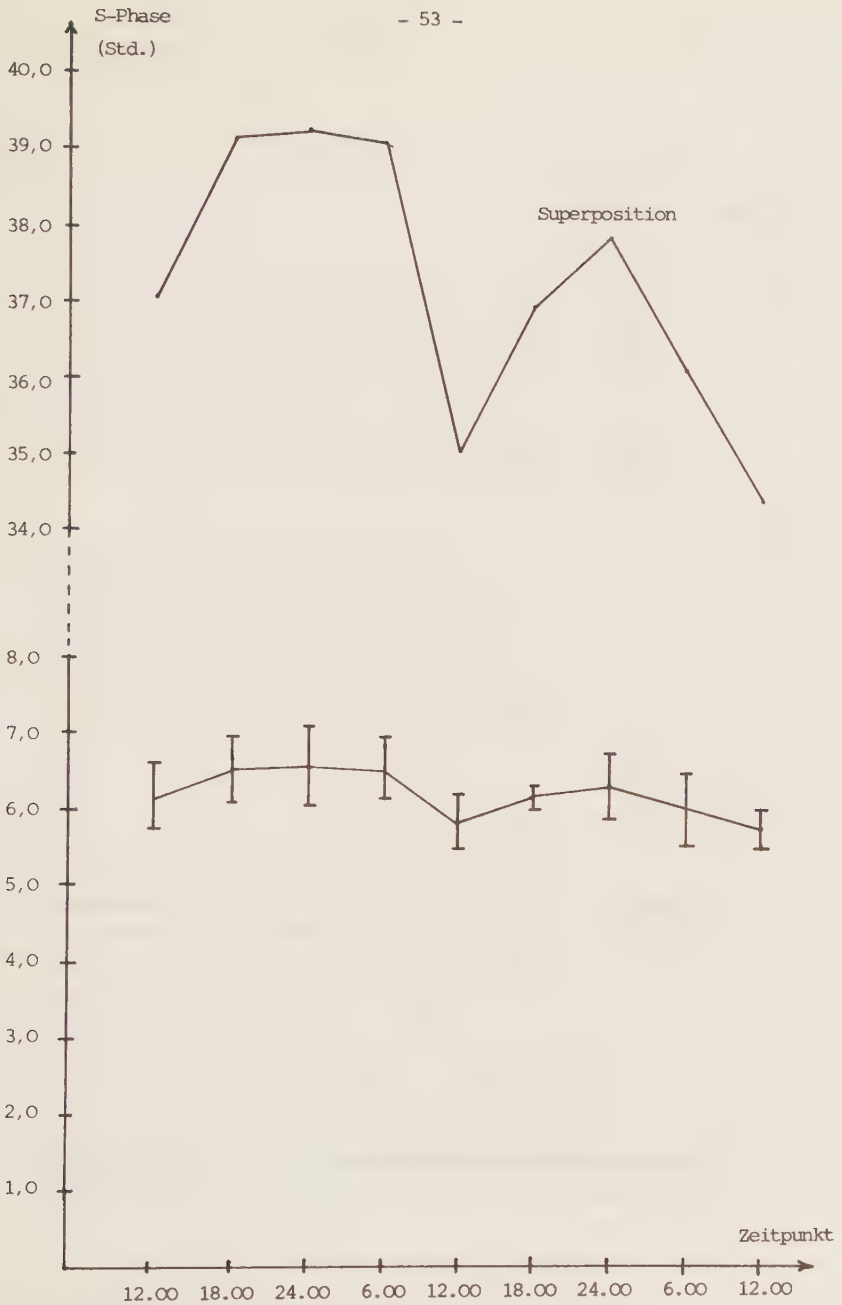


Abb. 9 Erläuterung im Text

(Siehe auch Tab. 7)

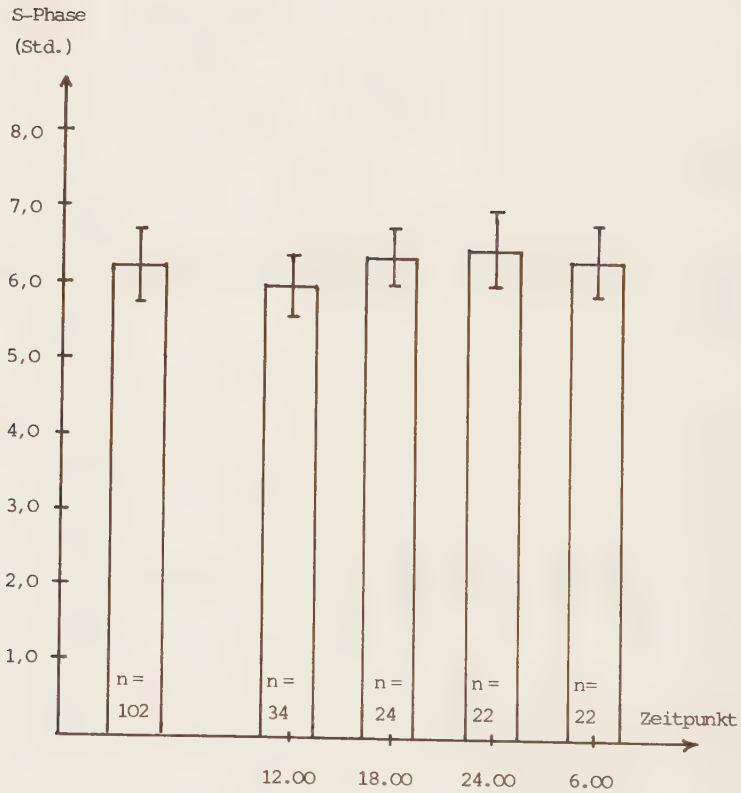


Abb. 10 Zusammenfassung der sechs Versuche
(Siehe auch Tab. 8)

H. DISKUSSION

I. Diskussion der Methodik

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob die Dauer der DNS-Synthesephase der proliferierenden Zellen menschlicher Epidermis tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Die Schwierigkeit besteht hierbei in der Wahl der Untersuchungsmethodik, wobei eine möglichst geringe Belastung der Versuchspersonen und gleichzeitig verwertbare, das heißt, exakte Ergebnisse angestrebt werden.

Diese Schwierigkeiten bzw. methodischen Unzulänglichkeiten dokumentieren z. B. die zahlreichen Versuche verschiedener Autoren, die der Psoriasis vulgaris zugrunde liegenden Proliferationsstörungen der Epidermis zellkinetisch zu erfassen. Insbesondere sind die Ergebnisse hinsichtlich der S-Phasendauer bzw. deren Änderungen zum Teil widersprüchlich, wie die schon erwähnte Literaturzusammenstellung von Gelfant (29) zeigt.

So postulieren z. B. Weinstein et al. (80) eine um den Faktor 2 verkürzte Dauer der S-Phase bei Psoriasis. Der von ihnen bestimmte Wert für die Länge der DNS-Synthesephase normaler Epidermis beträgt 16 Stunden, der für die psoriatische Haut 8,5 Stunden. Diese Ergebnisse wurden mittels der Methode markierter Mitosen ermittelt. Auf die Problematik der Anwendung dieser Methode beim Menschen wurde bereits hingewiesen (siehe S. 16). Auffällig ist, daß der so ermittelte Normalwert von 16 Stunden mit Abstand der höchste in Gelfants Literaturzusammenstellung ist. Auch der mit 11,5 Stunden zweithöchste Wert, von Chopra und Flaxman (15) bestimmt, basiert auf der Methode markierter Mitosen. Im Gegensatz zu Weinstein et al. führten

diese Autoren ihre Versuche nicht in vivo, sondern an einer aus menschlicher Abdominalhaut hergestellten Gewebekultur durch.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, daß die Methode markierter Mitosen für die S-Phasenlänge zu hohe Werte liefert. So führten z. B. Gibbs und Casarett (30) Versuche an der Wangenschleimhaut von Hamstern durch, wobei sie bei Anwendung der genannten Methode eine S-Phasendauer von 10 Stunden fanden, während Versuche mit der Doppelmarkierung einen Wert von 5 Stunden ergaben. Die beiden Autoren führen diese Diskrepanz im wesentlichen auf eine durch die Radioaktivität des markierten Thymidins bewirkte Mitosehemmung zurück, die in ihrem Grad von der spezifischen Aktivität der gewählten Verbindung abhängig ist. Darüberhinaus verweisen sie auch auf möglicherweise bestehende circadiane Schwankungen der Zellflußraten zwischen den einzelnen Compartments, hier insbesondere von der G_2 - in die Mitosephase. Da derartige Variationen der Flußraten auch die Ergebnisse von Doppelmarkierungsversuchen zu beeinflussen vermögen, wird auf diese Problematik später noch näher einzugehen sein. Auch dürften sie für die Erklärung zu hoher, mit der Methode markierter Mitosen ermittelter S-Phasenlängen eine untergeordnete Rolle spielen.

Die meisten Untersucher, die zur Klärung der bei Psoriasis gestörten Proliferationen Bestimmungen der DNS-Synthesedauer durchführten, benutzten eine der Doppelmarkierungsmethoden, die den entscheidenden Vorteil bieten, nicht auf die Anwesenheit von Mitosen angewiesen zu sein. Nach Gelfants Ansicht weisen Ergebnisse dieser Autoren darauf hin, daß bei der Psoriasis die S-Phase, im Gegensatz zur Ansicht von Weinstein et al., eher verlängert als verkürzt ist. Dies unterstreicht auch eine Arbeit von Pullmann et al. (58), die für die gesunde Epidermis eine S-Phase von durchschnittlich 6,6 Stunden

bestimmten, während der Mittelwert für die psoriatisch veränderte Haut bei 14,4 Stunden lag.

Wie schon des öfteren ausgeführt, erfordert die Anwendung der Doppelmarkierungsmethode für Untersuchungen an menschlichem Gewebe in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine Inkubation unter in-vitro-Bedingungen. Da die Qualität der so ermittelten Ergebnisse im wesentlichen davon abhängt, wie weit es gelingt, während der gesamten Versuchsdauer einen ungestörten Ablauf der DNS-Synthese aufrechtzuerhalten, soll im folgenden unser eigenes methodisches Vorgehen im Vergleich zu dem anderer Untersucher erläutert und begründet werden.

Von ihren Erstbeschreibern wurde die Doppelmarkierungsmethode ausschließlich in Tierversuchen oder an Pflanzen angewandt (37, 52, 81). Sie verabfolgten daher den radioaktiv markierten DNS-Vorläufer den noch lebenden Organismen, z. B. durch Injektion, so daß sein Einbau unter in-vitro-Bedingungen stattfand. Die auf diese Weise erreichte Markierung bezeichnet man als "Pulsmarkierung". Damit soll ausgedrückt werden, daß durch dieses Vorgehen alle Zellen markiert werden, die zum Zeitpunkt der Injektion gerade DNS synthetisieren. In dem Zeitraum Δt zwischen den beiden Injektionen erfolgt wegen der kurzen Verfügbareitsdauer des ^3H -Thymidin (74) keine Markierung.

Unter den in-vitro-Bedingungen der Inkubation wird dagegen während des gesamten Zeitraumes, in dem sich das zu untersuchende Gewebe im Nährmedium befindet, markiertes Thymidin in die DNS eingebaut (das heißt, wenigstens solange keine störenden Einflüsse auftreten).

Um den Bedingungen der Pulsmarkierung möglichst nahe zu kommen, wurde von einigen Autoren, wie z. B. Heenen und Galand (34), folgendes Vorgehen gewählt: Nach einer initialen 15minütigen Inkubation in einem Nährmedium, das den für die erste

Markierung vorgesehenen Tracer enthält, wird das Gewebe für 60 Minuten (Δt) in inaktives Medium gegeben. Abschließend erfolgt eine wiederum 15minütige Inkubation zum Zwecke der zweiten Markierung.

Wie schon an anderer Stelle erwähnt (siehe S. 12), ist, um eine Markierung aller in der S-Phase befindlicher Zellen zu erreichen, eine gewisse Mindestinkubationsdauer einzuhalten. Die Versuche verschiedener Autoren (35, 36, 20) zeigten, daß die bei nur 15minütiger Inkubation bestimmten Markierungsindices stets unter den in vivo ermittelten lagen.

Schmid et al. (73) bestimmten an der Wangenschleimhaut zweier männlicher Ratten die Dauer der DNS-Synthesephase, wobei sie wie oben beschrieben vorgingen. Für ein Tier fanden sie einen Wert von 9 Stunden, während der für das andere Tier ermittelte 16 Stunden betrug. Möglicherweise ist dieser große Unterschied mit auf die zu kurzen Inkubationszeiten zurückzuführen.

Für die vorliegende Untersuchung wählten wir deshalb einen Weg, wie er ähnlich auch von anderen Autoren (58) beschritten wurde: Während des gesamten Zeitraumes t inkubierten wir die Hautstückchen in Nährmedium, dem das für die erste Markierung vorgesehene ^{14}C -Thymidin beigelegt worden war. Nach einer kurzen Auswaschphase folgte unmittelbar eine ebensolang dauernde Inkubation in einem ^3H -Thymidin-haltigen Nährmedium zum Zwecke der zweiten Markierung. Auch dieses Vorgehen ermöglicht die Berechnung der S-Phasenlänge nach der für in-vivo-Doppelmarkierungen angegebenen Formel (siehe S. 19), wobei Δt die Dauer einer Inkubation angibt.

Die meisten Untersucher lassen die beiden Markierungen in einem 60minütigen Abstand aufeinanderfolgen. Bei dem soeben beschriebenen Vorgehen resultiert daher eine gesamte Versuchsdauer von über 2 Stunden. Bekanntlich ist bei längeren Inku-

bationszeiten mit Störungen der DNS-Synthese zu rechnen. Der Zeitpunkt ihres Eintretens wird in der Literatur unterschiedlich angegeben und ist wohl auch stark von methodischen Einzelheiten abhängig. So existieren Befunde, die von derartigen Störungen bereits ab der 30. Minute (33) oder der ersten Stunde (71, 73) berichten. Andere Autoren weisen auf eine Kontinuität der DNS-Synthese während der ersten beiden Inkubationsstunden (59) bzw. sogar über einen Zeitraum von 3 Stunden (47, 36) hin.

Um sowohl der Gefahr ungenügender Markierung zu entgehen als auch die Möglichkeit störender Inkubationseinflüsse gering zu halten, wählten wir in unseren eigenen Untersuchungen für jede der beiden Markierungen eine Inkubationsdauer von 40 Minuten. Auf diese Weise vergingen vom Zeitpunkt der Biopsie bis zum Beginn der Fixierung pro Versuch ca. 90 Minuten, womit es uns gelang, deutlich unter der Zweistundengrenze zu bleiben. Zur Gewährleistung optimaler Inkubationsbedingungen trafen wir Maßnahmen, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Besonderes Augenmerk richteten wir dabei auf die Temperatur des Inkubationsmediums. Für gewöhnlich werden autoradiographische in-vitro-Versuche bei $+37^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Dies mag bei der Untersuchung von Biopsieproben innerer Organe oder der Wangenschleimhaut in etwa den physiologisch herrschenden Bedingungen entsprechen, für die menschliche Epidermis gelten jedoch niedrigere Werte (64). Darüberhinaus unterliegt auch die Hauttemperatur circadianen Schwankungen (28).

Da eine Messung der jeweils zu den Entnahmezeitpunkten an der epidermalen Basalmembran herrschenden Temperatur technisch nicht möglich war, wurden Vorversuche durchgeführt, deren Ergebnisse im einzelnen in der Habilitationsschrift

von Schell veröffentlicht sind (67). Dabei zeigte sich, daß die geringsten Unterschiede der ^3H -Indices gleichzeitig inkubierter Hautstückchen bei einer Temperatur des Nährmediums von $+32^\circ\text{C}$ auftraten. Demzufolge führten wir alle der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Versuche bei der genannten Inkubationstemperatur durch. Auch hierbei zeigten sich zwischen den beiden jeweils zum gleichen Zeitpunkt inkubierten Hautstückchen durchwegs relativ geringe Unterschiede der berechneten Werte (im Durchschnitt betrug die Abweichung 0,22 Stunden).

Die Verwendung des von Dr. med. Rosenberger konstruierten Inkubators ermöglichte neben der Einhaltung konstanter Temperaturbedingungen die Inkubation in einer reinen Sauerstoffatmosphäre bei einem O_2 -Partialdruck von 2,2 atm (= 222915 Pa). Auf diese Weise gelang es, den markierten Randbereich der untersuchten Hautstückchen soweit auszudehnen, daß eine durchgehende Auswertung aller Schnitte bis zu einer Tiefe von $400\text{ }\mu$ problemlos möglich war.

Daß es uns mit Hilfe der angesprochenen Maßnahmen gelang, Inkubationsbedingungen zu schaffen, die einen Neueintritt von Zellen in die S-Phase auch während der zweiten Inkubationsperiode gewährleisteten, soll im folgenden belegt werden: Da das Erkennen rein ^3H -markierter Zellen im Gegensatz zu dem rein ^{14}C -markierter wesentlich einfacher ist, führten wir die Inkubation in dem ^3H -Thymidin-haltigen Nährmedium bewußt durchwegs an zweiter Stelle durch. Auf diese Weise erreichten wir eine selektive reine ^3H -Markierung all jener Zellen, die während der zweiten 40-Minutenperiode neu in die DNS-Synthesephase eintraten. In jedem der 102 zur Auswertung gelangten Hautstückchen konnten rein ^3H -markierte Zellkerne eindeutig identifiziert werden, ohne die ja auch eine Berechnung der S-Phasenlänge nicht möglich gewesen wäre.

Als Gesamtmittelwert aus den für die einzelnen Biopsieproben ermittelten Ergebnissen berechneten wir eine Dauer der DNS-Synthesephase von 6,20 Stunden. Mit diesem Wert liegen wir in einem Bereich, der sich mit den Resultaten anderer Autoren deckt. So liegen die bei Gelfant (29) zitierten Angaben über die durch Doppelmarkierung (in vivo und in vitro) an gesunder menschlicher Epidermis ermittelten S-Phasenlängen zwischen 5,9 und 10,3 Stunden.

Vor der Diskussion der von uns für die unterschiedlichen Tageszeiten ermittelten Werte muß auf ein Problem eingegangen werden, das sich aus der Tatsache der für die menschliche Epidermis nachgewiesenen Schwankungen des Markierungsindex ergibt. In einer ihrer Arbeiten weisen Pilgrim und Maurer (55) darauf hin, daß eine einzelne zu einem beliebigen Zeitpunkt durchgeführte Bestimmung der S-Phasenlänge nur dann zu einem der Realität entsprechenden Ergebnis führen kann, wenn die untersuchte Zellpopulation asynchron wächst. In diesem Fall ist gewährleistet, daß "die Anzahl der Zellen von der Zeit unabhängig und die Häufigkeitsverteilung der Zellen über den Generationszyklus konstant" ist. Bei Geweben, die tageszeitliche Schwankungen des ^3H -Indexes aufweisen, liegen dagegen innerhalb des Generationszyklus je nach Untersuchungszeitpunkt wechselnde Teilsynchronisationen der Zellen vor. Diese werden durch eine schwankende Anzahl von Zellen, die pro Zeiteinheit neu in die S-Phase eintreten, hervorgerufen. Von Pilgrim und Maurer an verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte durchgeführte Bestimmungen der S-Phasenlänge zu unterschiedlichen Tageszeiten ergaben scheinbare Schwankungen der Werte um einen Faktor von 2 bis 3. In derselben Arbeit durchgeführte Bestimmungen der Silberkornzahlen/markiertem Zellkern deuten jedoch auf eine Konstanz der S-Phasenlänge hin.

Auf die vorliegende Arbeit angewendet, bedeutet dies, daß bei dem von uns gewählten Vorgehen auch dann mit der Ermittlung

unterschiedlicher Werte zu rechnen ist, wenn in Wirklichkeit eine Konstanz der S-Phasenlänge im Tagesverlauf vorliegt. Wie aus dem Ergebnisteil hervorgeht, unterscheiden sich die von uns zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelten Werte bei weitem nicht in dem von Pilgrim und Maurer gefundenen Ausmaß, obgleich Schwankungen der Markierungsindeces erwiesen sind. Es zeigt sich lediglich eine gewisse Häufung niedriger Werte um 12.00 Uhr (Mittelwert 5,92 Stunden), während der höchste Mittelwert mit 6,43 Stunden für die um Mitternacht entnommenen Hautstückchen berechnet wurde. Die Diskussion dieses Befundes wird unter anderem Aufgabe des folgenden Abschnittes sein.

II. Diskussion der Ergebnisse

Nach unseren Ergebnissen zeigt die S-Phasenlänge der menschlichen Epidermis im Tagesverlauf eine relative Konstanz. Bei einem Mittelwert von 6,20 Stunden bewegen sich die Schwankungen zwischen den Werten 5,50 Stunden und 7,50 Stunden. Die statistische Prüfung, ob bei den einzelnen Versuchspersonen und nach Zusammenfassung der zu jedem Versuchszeitpunkt erhaltenen Einzelwerte aller sechs Versuchspersonen Schwankungen der S-Phasenlänge nachzuweisen sind, erfolgte mit dem t-Test. Hierbei zeigte sich, daß die gefundenen Variationen statistisch nicht signifikant sind.

Zunächst liegt die Vermutung nahe, daß die erwähnten geringen Schwankungen methodisch sein könnten oder durch Fehler bei der Auswertung, das heißt, bei der Unterscheidung zwischen ^{14}C - und ^3H -markierten Kernen, entstanden sind.

Bei genauerer Betrachtung unserer Werte fällt jedoch auf, daß diese eine gewisse Ordnung aufweisen. Es zeigt sich nämlich eine Häufung niedriger Werte bei den jeweils um 12.00 entnommenen

Hautproben. Folgende Mittelwerte wurden aus allen für die drei mittäglichen Biopsiezeitpunkte ermittelten Daten berechnet: 6,18 Stunden, 5,83 Stunden und 5,73 Stunden. Der Gesamtmittelwert aus allen 12.00 Uhr-Werten beträgt 5,92 Stunden.

Demgegenüber besteht eine Häufung höherer Werte für die jeweils um Mitternacht entnommenen Hautstückchen. Die entsprechenden Mittelwerte sind: 6,55 Stunden und 6,31 Stunden, Gesamtmittelwert: 6,43 Stunden.

Dieser Sachverhalt läßt sich zeichnerisch durch die sogenannte "Superposition" verdeutlichen (siehe Abb. 9). Hierbei wurden den auf der Abszisse aufgetragenen Biopsiezeitpunkten auf der Ordinate die Summe aller pro Zeitpunkt ermittelten Einzelwerte gegenübergestellt.

Die Vermutung, daß die eben beschriebenen Unterschiede nicht alleine zufalls- bzw. methodisch bedingt sein könnten, wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Abweichungen zwischen den beiden für die jeweils gleichzeitig bei jedem Probanden entnommenen Hautstückchen ermittelten Werten durchwegs sehr gering sind. Im Durchschnitt betrug der Unterschied 0,22 Stunden.

Um festzustellen, ob die - statistisch zwar nicht relevanten - Schwankungen der S-Phasenlänge eine Rhythmik erkennen lassen, wurde das eigens für Fragen der Rhythmusforschung entwickelte Varianz- oder Powerspektrum angewandt, welches sogenannte "Zeitreihen" auf das Vorliegen rhythmischer Variationen prüft (Lit. bei 67). Hierbei ließ sich jedoch keine Rhythmik nachweisen.

Möglicherweise deuten diese Befunde darauf hin, daß die Dauer der DNS-Synthesephase menschlicher Epidermiszellen so gering-

gradigen circadianen Schwankungen unterliegt, daß sie bei Betrachtung der in vorliegender Arbeit ermittelten Ergebnisse nur andeutungsweise erkennbar, mit mathematisch-statistischen Methoden jedoch nicht abzusichern sind. Der Nachweis so geringer Schwankungen, wie sie im vorliegenden Fall vermutet werden können, dürfte nur gelingen, wenn zum einen die Methodik weiter verfeinert, eventuell eine in-vivo-Methode (z. B. markierte Mitosen) angewandt würde und zum anderen eine bedeutend größere Zahl von Versuchspersonen zur Verfügung stünde. Auf die methodischen und versuchsbedingten Probleme bei biorhythmischen Untersuchungen an Menschen wurde bereits vorangehend ausführlich eingegangen.

Kann auch die Frage, ob die S-Phasenlänge der menschlichen Epidermis zumindest minimalen tageszeitlichen Variationen unterliegt aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden, so läßt sich jedoch eine für die Erforschung der Proliferationskinetik weit wichtigere Aussage formulieren: Die mehrfach beschriebenen, insbesondere auch in einer parallel zur vorliegenden Versuchsreihe an denselben Versuchspersonen und zu denselben Zeitpunkten ermittelten deutlichen Schwankungen des ^3H -Indexes (67) sind nicht durch Schwankungen der S-Phasenlänge bedingt. Weder in ihrem Ausmaß, noch in ihrem zeitlichen Ablauf besteht ein Zusammenhang mit den von uns gefundenen Werten. Dies bedeutet, daß die bewiesenen Variationen des Markierungsindex im Sinne "echter" Proliferationsschwankungen dadurch hervorgerufen werden, daß zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine unterschiedliche Zahl von Zellen, bedingt durch eine Teilsynchronisation in der späten G_1 -Phase, in die S-Phase eintritt. Auch ist die von Schell (67) an vier unserer sechs Versuchspersonen bewiesene negative und zeitverschobene Korrelation des Serumcortisolspiegels mit dem ^3H -Index nicht mit den hier gefundenen Maxima und Minima der S-Phasenlänge in eine Beziehung zu setzen. Dies deutet auf die we-

sentliche Bedeutung des genannten Hormons für die tageszeitlichen Schwankungen der epidermalen Proliferation hin.

Im Zusammenhang mit Fragen tageszeitlicher Proliferationschwankungen der Epidermis muß demnach aufgrund der von uns ermittelten Werte von einer relativen Konstanz der S-Phasenlänge ausgegangen werden.

Mit diesem Ergebnis stehen wir im Widerspruch zu einzelnen von anderen Autoren (76, 14, 70) in Tierversuchen ermittelten Resultaten (siehe S. 28 f.). Von besonderem Interesse ist hierbei die Arbeit von Tvenmyr (76), da sie ihre Versuche an der Epidermis haarloser Mäuse durchführte und daher ein Vergleich mit den von uns gefundenen Ergebnissen wohl am ehesten zulässig ist. Mit ihrer, von unserer grundsätzlich verschiedenen, Methode bestimmte sie über die Ermittlung der stündlichen Austrittsrate von Zellen aus der S-Phase (siehe auch S. 28 f.) eine Schwankung der DNS-Synthesephasenlänge zwischen den Werten 5 bis 12 Stunden, also Schwankungen um den Faktor 2.

Demgegenüber fanden die Mehrzahl anderer Untersucher wie auch wir eine relative Konstanz der S-Phasenlänge (55, 4, 31, 38, 58). Auf diese Ergebnisse wurde bereits im einzelnen eingegangen (siehe S. 27 und 29). Hier soll nur noch einmal die bisher einzige an gesunder menschlicher Epidermis durchgeführte Untersuchung erwähnt werden, die von Pullmann et al. (58) beschrieben wurde. Bei einem Gesamtmittelwert von 6,60 Stunden fanden auch sie zu den verschiedenen Biopsiezeitpunkten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung ihrer allerdings in der Anzahl geringen Einzelwerte zeichnet sich jedoch, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, zur Mittagszeit eher eine Häufung höherer Werte ab. Die Aussagekraft dieses Befundes wird neben der geringen Anzahl von Versuchspersonen auch durch die Tatsache eingeschränkt, daß es

sich hierbei nicht, wie in unserem Fall, um eine Longitudinalstudie über einen längeren Versuchszeitraum handelt.

Bei zusammenfassender Betrachtung der vorliegenden und der von Schell (67) an denselben Probanden ermittelten Ergebnisse läßt sich feststellen, daß diese sich gut in die Mehrzahl der in der Literatur mitgeteilten Befunde einfügen lassen und darauf hindeuten, daß auch beim Menschen die epidermale Proliferation nicht konstant verläuft, sondern tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, die aufgrund der relativen Konstanz der S-Phasenlänge echte Proliferationsschwankungen darstellen.

Darüberhinaus konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß es bei sorgfältiger Auswahl der Inkubationsbedingungen gelingt, mit Hilfe der Histoautoradiographie auch unter in-vitro-Bedingungen relevante Aussagen über das proliferative Verhalten frisch entnommenen Biopsiematerials zu erhalten. Insbesondere unter dem zur Zeit aktuellen Gesichtspunkt des Strahlenschutzes wird daher für Untersuchungen am Menschen dieser Methode, bei zu erwartender weiterer Vervollkommenung und vernünftiger Einschränkung der Fragestellung, gegenüber den in vivo anzuwendenden der Vorzug zu geben sein.

I. ZUSAMMENFASSUNG

Tageszeitliche Schwankungen des histoautoradiographisch ermittelten Markierungsindex (^3H -Index) sind für die gesunde menschliche Epidermis erwiesen. Eine Deutung dieser Schwankungen als Veränderungen der Proliferationsrate ist nur dann zulässig, wenn von einer konstanten Dauer der DNS-Synthesephase, also jener Phase, in der die radioaktive Markierung erfolgt, ausgegangen werden kann. Die zur Klärung dieser Frage von verschiedenen Autoren zumeist in Tierversuchen ermittelten Befunde widersprechen sich zum Teil.

An sechs hautgesunden Männern, die sich für die vorliegende Untersuchung freiwillig zur Verfügung stellten, wurde daher die S-Phasenlänge proliferierender Epidermiszellen im Hinblick auf mögliche, von der Tageszeit abhängige, Variationen untersucht.

Dabei kam eine histoautoradiographische Doppelmarkierungsmethode zur Anwendung. Zum Schutz der Versuchspersonen vor Strahlenschäden erfolgte die radioaktive Markierung der entnommenen Hautproben in einem Nährmedium unter in-vitro-Bedingungen. Die Qualität derartig ermittelter Ergebnisse, das heißt, ihre Übereinstimmung mit den in vivo herrschenden Verhältnissen, wird wesentlich durch die Auswahl der sogenannten Inkubationsbedingungen (Temperatur des Nährmediums, Inkubationsdauer, Sauerstoffpartialdruck) bestimmt. Basierend auf den Erkenntnissen vorangegangener Untersuchungen sowie eines Vorversuches wurde folgendermaßen vorgegangen:

Während eines 48stündigen Zeitraumes wurden von der linken Oberarminnenseite der jeweiligen Versuchsperson in sechsstündigem Abstand je zwei Hautproben unter Lokalanästhesie entnommen. Zunächst erfolgte eine 40minütige Inkubation in einem ^{14}C -Thymidin-haltigen Nährmedium. Nach einer kurzen Auswasch-

phase in inaktivem Medium wurden die Hautstückchen für weitere 40 Minuten in das nun ^3H -Thymidin enthaltende Nähmedium gegeben. Die Temperatur des Mediums betrug $+32^{\circ}\text{C}$, der Sauerstoffpartialdruck 2,2 atm (= 222915 Pa).

Die Berechnung der S-Phasenlänge erfolgte, nach mikroskopischer Auswertung der Autoradiogramme, aus dem Verhältnis ^{14}C -markierter zu rein ^3H -markierten Zellen, unter Berücksichtigung des 40minütigen Inkubationszeitraumes. Der aus allen Einzelergebnissen ermittelte Gesamtmittelwert für die Dauer der DNS-Synthesephase beträgt 6,20 Stunden. Die statistische Auswertung der für die unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte ermittelten Werte ergab weder signifikante rhythmische noch andersartige tageszeitliche Schwankungen, obwohl eine gewisse Häufung geringgradig höherer bzw. niedrigerer Werte um 24.00 Uhr bzw. um 12.00 Uhr auffiel.

Es muß also von einer relativen Konstanz der DNS-Synthesedauer menschlicher Epidermis im Tagesverlauf ausgegangen werden, so daß die gefundenen deutlichen Variationen des ^3H -Indexes als Hinweis auf "echte" Proliferationsschwankungen zu deuten sind.

Darüberhinaus wird die Ansicht vertreten, daß mit Hilfe der angewandten Methode bei Einhaltung geeigneter Inkubationsbedingungen auch unter in-vitro-Bedingungen verwertbare Ergebnisse erzielt werden können.

K. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amlacher, E.: Autoradiographie in Histologie und Cytologie. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1974)
2. Blumenfeld, C. M.: Periodic mitotic activity in the epidermis of the albino rat. Science, 90 (1939) 446 - 447
3. Broders, A. C., W. B. Dublin: Rhythmicity of mitosis in the epidermis of human beings. Proc. Mayo Clin., 19 (1939) 423 - 425
4. Brown, J. M., R. J. Berry: The relationship between diurnal variation of the number of cells in mitosis and of the number of cells synthesizing DNA in the epithelium of the hamster cheek pouch. Cell Tissue Kinet., 1 (1968) 23 - 33
5. Brues, A. M., H. Auerbach, G. M. Deroche, D. D. Grube: Mechanisms of carcinogenesis. Argonne Nat. Lab. Ann. Rep. ANL-7635 (1969) 115 - 119
6. Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York (1973)
7. Bullough, W. S.: Mitotic activity in the adult male mouse, *Mus musculus* L. The diurnal cycles and their relation to waking and sleeping. Proc. Roy. Soc. London, B (1948) 212 - 233
8. Bullough, W. S.: The effects of experimentally induced rest and exercise on the epidermal mitotic activity of the adult male mouse, *Mus musculus* L. Proc. Roy. Soc. London, B (1948) 233 - 242
9. Bullough, W. S., E. B. Laurence: The control of epidermic mitotic activity in the mouse. Proc. Roy. Soc. London, B, 151 (1960) 517 - 536

10. Bullough, W. S., E. B. Laurence: The diurnal cycle in epidermal mitotic duration and its relation to chalone and adrenalin. *Exp. Cell Res.*, 43 (1966) 343 - 350
11. Bullough, W. S., E. B. Laurence: The role of glucocorticoid hormones in the control of epidermal mitosis. *Cell Tissue Kinet.*, 1 (1968) 5 - 10
12. Buselmaier, W.: *Biologie für Mediziner*. Springer-Verlag, Berlin (1974)
13. Cameron, I. L., R. C. Greulich: Evidence for an essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelia of the adult mouse. *J. Cell Biol.*, 18 (1963) 31 - 40
14. Chiakulas, J. J., L. E. Scheving: Circadian phase relationship of H3 thymidine uptake, numbers of labeled nuclei, grain counts and cell division rate in larval urodele epidermis. *Exp. Cell Res.*, 44 (1966) 256 - 262
15. Chopra, D. P., B. A. Flaxman: Human epidermal cell cycle in vitro. *Br. J. Derm.*, 87 (1972) 13 - 17
16. Christophers, E., E. Schaumlöffel: Zur DNS-Synthesezeit der menschlichen Epidermis. *Arch. klin. exp. Derm.*, 228 (1967) 57 - 64
17. Conroy, R. T. W. L., J. N. Mills: *Human circadian rhythms*. London: Churchill (1970)
18. Cooper, Z. K., A. Schiff: Mitotic rhythm in human epidermis. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 39 (1938) 323 - 324
19. Cooper, Z. K.: Mitotic rhythm in human epidermis. *J. invest. Derm.*, 2 (1939) 289 - 300

20. De la Brassine, M., J. M. Lachapelle: Etude radioautographique de l'incorporation in vitro de thymidine-³H dans l'épiderme humain normal. Influence du temps d'incubation sur la régularité du marquage. Bull. Soc. franc. Derm. Syph., 79 (1972) 140 - 142
21. Droogleever Fortuyn - Van Leyden, C. E.: Day and night period in nuclear divisions. Proc. Kon. ned. Akad. Wet., 29 (1926) 979 - 988
22. Duell, E. A., W. H. Kelsey, J. J. Voorhees: Epidermal chalone - past to present concept. J. invest. Derm., 65 (1975) 67 - 70
23. Duspiva, F.: Biochemie der Mitose. In: Handb. allg. Path., II/2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968)
24. Fabrikant, J. I., C. L. Wissemann, M. J. Vitak: The kinetics of cellular proliferation in normal and malignant tissues. II. An in vitro method for incorporation of tritiated thymidine in human tissues. Radiology, 92 (1969) 1309 - 1320
25. Fisher, L. B.: Determination of the normal rate and duration of mitosis in human epidermis. Br. J. Derm., 80 (1968) 24 - 28
26. Fisher, L. B.: The diurnal mitotic rhythm in the human epidermis. Br. J. Derm., 80 (1968) 75 - 80
27. Fukuyama, K., T. Nakamura, I. A. Bernstein: DNA synthesis in human skin studied in vitro by autoradiography. J. invest. Derm., 44 (1965) 29 - 32
28. Gautherie, M.: Circadian rhythm in the vasomotor oscillations of skin temperature in man. Int. J. Chronobiol., 1 (1973) 103 - 139

29. Gelfant, S.: The cell cycle in psoriasis: a reappraisal.
Br. J. Derm., 95 (1976) 577 - 590
30. Gibbs, S. J., G. W. Casarett: Influences of a circadian rhythm and mitotic delay from tritiated thymidine on cytokinetic studies in hamster cheek pouch epithelium.
Radiation Res., 40 (1969) 588 - 600
31. Grube, D. D., H. Auerbach, A. M. Brues: Diurnal variation in the labeling index of mouse epidermis: a double isotope autoradiographic demonstration of changing flow rates.
Cell Tissue Kinet., 3 (1970) 363 - 373
32. Halberg, F., J. J. Bittner, D. Smith: Belichtungswechsel und 24-Stundenperiodik von Mitosen im Hautepithel der Maus.
Zeitschr. f. Vitamin-Hormon-Fermentforschung, 9 (1957) 69 - 73
33. Heckel, A.: Autoradiographische Untersuchungen über den Verlauf des ^3H -Indexes in der Wangenschleimhaut der erwachsenen männlichen Ratte bei Inkubation über mehrere Stunden.
Inaug. Diss., Erlangen, in Vorbereitung
34. Heenen, M., P. Galand: Cell population kinetics in human epidermis: in vitro autoradiographic study by double-labeling method. J. invest. Derm., 56 (1971) 425 - 429
35. Helpap, B., W. Maurer: Autoradiographische Untersuchungen zur Frage der Vergleichbarkeit des Einbaues von markiertem Thymidin unter in vivo Bedingungen und bei Inkubation von Gewebeproben. Virch. Arch. B Zellpath., 4 (1969) 102 - 118
36. Helpap, B., R. Stiens, V. Grouls: Autoradiographische Untersuchungen zum Thymidineinbau nach mehrstündiger Inkubation von Rattenlebern. Histochemie, 34 (1973) 305 - 316

37. Hilscher, W., W. Maurer: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C-14- und H-3Thymidin. Die Naturwissenschaften, 49 (1962) 352
38. Izquierdo, J. N., S. J. Gibbs: Circadian rhythms of DNA synthesis and mitotic activity in hamster cheek pouch epithelium. Exp. Cell Res., 71 (1972) 402 - 408
39. Jarrett, A.: Epidermal kinetics. In: The physiology and pathophysiology of the skin. V. 1: The epidermis. Academic Press, London (1973) 91 - 121
40. Kahn, G., G. D. Weinstein, P. Frost: Kinetics of human epidermal cell proliferation: diurnal variation. J. invest. Derm., 50 (1968) 459 - 462
41. Koburg, E., W. Maurer: Autoradiographische Untersuchung mit (³H) Thymidin über die Dauer der Desoxyribonukleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darm-epithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochim. biophys. Acta (Amst.), 61 (1962) 229 - 242
42. Lachapelle, J. M.: Isotopic labelling of cutaneous structures. A preliminary comparison of local in vivo and in vitro techniques applied to healthy and pathological human skin. Br. J. Derm., 81 (1969) 299 - 305
43. Lachapelle, J. M., T. Gillman: Tritiated thymidine labelling of normal human epidermal cell nuclei. Br. J. Derm., 81 (1969) 603 - 616
44. Lachapelle, J. M.: Validité de la méthode "in vitro" comme méthode de marquage instantané de la peau par la thymidine tritiée. Ann. Derm. Syph., 97 (1970) 522 - 524

45. Lachapelle, J. M.: Etude radioautographique de l'incorporation in vitro de thymidine tritiée dans la peau humaine normale et dans certaines proliférations épidermiques. Path. Europ., 5, Suppl. 1 (1970) 1 - 216
46. Lennartz, K. J., W. Maurer: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und der Generationszeit beim Ehrlich-Ascitestumor der Maus durch Doppelmarkierung mit C-14- und H-3-Thymidin. Zeitschr. f. Zellforschung, 63 (1964) 478 - 495
47. Lennartz, K. J., H. O. Klein, W. Feaux de Lacroix, P. J. Klein: Vergleichende in vivo- und in vitro-Untersuchung der Zellkinetik experimenteller Tumoren und die Bestimmung des Generationszyklus von Tumorzellen des Menschen in vitro. Verh. dtsh. Ges. Path., 55 (1971) 591 - 596
48. Marks, R., K. Fukui, K. Halprin: The application of an in vitro technique to the study of epidermal replication and metabolism. Br. J. Derm., 84 (1971) 453 - 460
49. Mendelsohn, M. L.: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H-mouse. III. The growth fraction. J. Nat. Cancer Inst., 28 (1962) 1015
50. Oehlert, W.: Regeneration, Hyperplasie und Cancerisierung am Beispiel der epithelialen Wechselgewebe. Hdb. allg. Path., Bd. VI/2, Springer-Verlag (1970) 244 - 374
51. Patt, H. M., H. Quastler: Radiation effects on cell renewal and related systems. Physiol. Rev., 43 (1963) 357
52. Pilgrim, Ch., W. Maurer: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit ³H- und ¹⁴C-Thymidin. Die Naturwissenschaften, 49 (1962) 544 - 545

53. Pilgrim, Ch., W. Erb, W. Maurer: Diurnal fluctuations in the numbers of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. *Nature (London)*, 199 (1963) 863
54. Pilgrim, Ch., K. J. Lennartz, K. Wegener, S. Hollweg, W. Maurer: Autoradiographische Untersuchung über tageszeitliche Schwankungen des H-3-Index und des Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Raten-Fetus, sowie bei Ascites-Tumorzellen. *Zeitschr. f. Zellforschung*, 68 (1965) 138 - 154
55. Pilgrim, Ch., W. Maurer: Autoradiographische Untersuchung über die Konstanz der DNS-Verdopplungs-Dauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin. *Exp. Cell Res.*, 37 (1965) 183 - 199
56. Pilgrim, Ch., W. Lang, W. Maurer: Autoradiographische Untersuchungen der Dauer der S-Phase und des Generationszyklus der Basalepithelien des Ohres der Maus. *Exp. Cell Res.*, 44 (1966) 129 - 138
57. Pinkus, H., R. Hunter: The direction of mitotic axis in human epidermis. *Arch. Derm. (USA)*, 94 (1966) 351 - 355
58. Pullmann, H., K. J. Lennartz, G. K. Steigleder: In vitro examination of cell proliferation in normal and psoriatic epidermis, with special regard to diurnal variations. *Arch. Derm. Forsch.*, 250 (1974) 177 - 184
59. Pullmann, H., H. Schumacher: Vergleichende autoradiographische in vitro-Untersuchungen zur Zellproliferation normaler und psoriatischer Epidermis bei Inkubation in autologem Plasma und in Eagles Basal Medium mit 10 % fetalem Kälberserum. *Arch. Derm. Res.*, 254 (1975) 327 - 332

60. Quastler, H., F. G. Sherman: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.*, 17 (1959) 420 - 438
61. Rajewski, M. F.: Thymidin-Inkorporation und O_2 -Konzentration in Explantaten normaler und maligner Gewebe in vitro. *Die Naturwissenschaften*, 52 (1965) 341 - 342
62. Rajewski, M. F.: Zellproliferation in normalen und malignen Geweben: 3H -Thymidin-Einbau in vitro unter Standardbedingungen. *Biophysik*, 3 (1966) 65 - 93
63. Reaven, E. P., A. J. Cox: Behavior of adult human skin in organ culture. II. Effects of cellophane tape stripping, temperature, oxygen tension, pH and serum. *J. invest. Derm.*, 50 (1968) 118 - 128
64. Rein, H.: Die Hauttemperatur des Menschen. In: *Hdb. d. Haut- und Geschlechtskrankheiten*, Bd. I/2, Berlin (1929) 8 - 20
65. Schell, H., G. H. Schmid, O. P. Hornstein, H. J. Zeissler: Untersuchungen über die Tagesperiodik des 3H -Indexes im Epithel der Wangenschleimhaut und in der Rückenepidermis der männlichen Ratte. *Arch. Derm. Forsch.*, 250 (1974) 253 - 260
66. Schell, H., H. Rosenberger, O. P. Hornstein, E. Wawra: Autoradiographic in vitro studies on diurnal variation in human epidermal cell proliferation. *Arch. Derm. Res.*, 257 (1977) 265 - 272
67. Schell, H.: *Biorhythmik und Epidermisproliferation*. Grosse-Verlag, Berlin (1978)

68. Scheving, L. E.: Mitotic activity in the human epidermis.
Anat. Rec., 135 (1959) 7 - 14
69. Scheving, L. E., J. E. Pauly: Daily mitotic fluctuations
in the epidermis of the rat and their relation to varia-
tions in spontaneous activity and rectal temperature.
Acta anat., 43 (1960) 337 - 345
70. Scheving, L. E., J. E. Pauly: Circadian phase relationships
of thymidine-³H uptake, labeled nuclei, grain counts, and
cell division rate in rat corneal epithelium. J. Cell
Biol., 32 (1967) 677 - 683
71. Schmid, G. H., O. P. Hornstein: Autoradiographische in-vitro-
Untersuchungen über den Einfluß der Inkubationsdauer auf die
DNA-Synthese psoriatischer Epidermiszellen von Stanzbiopsien
im Glutamin-freien Nährmedium. Virch. Arch. Abt. B Zellpath.,
15 (1974) 165 - 176
72. Schmid, G. H., H. Schell, O. P. Hornstein, H. U. Meisel,
H. J. Zeissler: Untersuchungen über die Dauer der DNS-Synthe-
sephase in der Wangenschleimhaut der männlichen Ratte. I. Ver-
gleich von zwei autoradiographischen Methoden in vivo. Virch.
Arch. B Cell Path., 17 (1974) 169 - 175
73. Schmid, G. H., H. Schell, O. P. Hornstein, U. Fischer, C.
Stosiek: Untersuchungen über die Dauer der DNS-Synthese-
phase in der Wangenschleimhaut der männlichen Ratte. II. Autoradio-
graphische Experimente in vitro. Virch. Arch. B Cell Path.,
17 (1974) 177 - 184
74. Schultze, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure-
und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: Hdb.
allg. Path., Bd. II/5, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York (1968)

75. Tvermyr, E. M. F.: Circadian rhythms in epidermal mitotic activity. *Virch. Arch. Abt. B Zellpath.*, 2 (1969) 318 - 325
76. Tvermyr, E. M. F.: Circadian rhythms in hairless mouse epidermal DNA-synthesis as measured by double labelling with H³-Thymidine (H³Tdr.). *Virch. Arch. Abt. B Zellpath.*, 11 (1972) 43 - 54
77. Voorhees, J. J., E. A. Duell, D. A. Chambers, C. L. Marceid: Regulation of cell cycles. *J. invest. Derm.*, 67 (1976) 15 - 19
78. Warburg, O.: The metabolism of tumors. Constable and Co., Ltd., London (1930)
79. Wegener, K., S. Hollweg, W. Maurer: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit und anderer Teil-Phasen des Zell-Zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte. *Zeitschr. f. Zellforschung*, 63 (1964) 309 - 326
80. Weinstein, G. D., G. Goldfaden, P. Frost: Methotrexate. Mechanism of action on DNA synthesis in Psoriasis. *Arch. Derm.*, 104 (1971) 236 - 243
81. Wimber, D. E., H. Quastler: A ¹⁴C and ³H-thymidine double labeling technique in the study of cell proliferation in *Tradescantia* root tips. *Exp. Cell Res.*, 30 (1963) 8 - 22
82. Wrba, H., H. Rabes, K. F. Merker, P. Doerr: Zur Bedeutung des O₂-Partialdruckes für die quantitative Bestimmung des Einbaues von radioaktiv markierten Verbindungen in Organ-explantate. *Exp. Cell Res.*, 45 (1966) 167 - 177

Herrn Prof. Dr. med. O. P. Hornstein danke ich für die
Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit an seiner
Klinik.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Oberarzt
Dr. med. habil. H. Schell für seine stete Hilfsbereitschaft
und seine wertvollen Ratschläge.

LEBENS LAUF

Am 15. April 1951 wurde ich als Sohn des Schuhmachers Erich Egdmann und seiner Ehefrau, der Buchhalterin Gerda Egdmann, geb. Göldner, in Bamberg geboren.

Der Wohnort der Familie befand sich damals in Burgebrach bei Bamberg. Dort trat ich im September des Jahres 1957 in die Volksschule ein.

Im Dezember des Jahres 1959 zogen meine Eltern und ich nach Memmelsdorf - Lichteneiche bei Bamberg um. Von diesem Zeitpunkt an besuchte ich die Volksschule in Bamberg - Gartenstadt.

Nach Absolvierung der vierten Volksschulklasse trat ich im Jahre 1961 in die Oberrealschule in Bamberg über.

Nach dem Umzug der Familie nach Nürnberg im Jahre 1963 besuchte ich das dortige Johannes-Scharrer-Gymnasium. An dieser Schule bestand ich im Jahre 1970 die Reifeprüfung.

Anschließend, während des Zeitraumes von Juli 1970 bis zum Dezember 1971, leistete ich in München meinen Grundwehrdienst ab.

Im April des Jahres 1972 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg ein Studium in dem Fach Chemie - Ingenieurwesen.

Im Wintersemester 1973/74 erhielt ich einen Studienplatz für das Fach Medizin an derselben Universität.

Am 26. August 1975 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, am 31. August 1976 den Ersten Abschnitt, am 31. August 1978 den Zweiten Abschnitt und am 15. Oktober 1979 den schriftlichen Teil des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung. Mit Bestehen des mündlichen Teiles des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung am 28. November 1979 schloß ich mein Studium ab.

Am 12. Dezember 1979 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Nürnberg, im Februar 1980

